

*Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München*

Ein genetischer Ansatz zur Analyse der
cAMP-abhängigen Modulation des
Schrittmacherkanals HCN4



Andreas Scharr

*aus
Augsburg*

2011

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 (in der Fassung der sechsten Änderungssatzung vom 16. August 2010) von Prof. Dr. Christian Wahl-Schott betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 28.11.2011

Andreas Scharr

Dissertation eingereicht am	28.11.2011
1. Gutachter	Prof. Dr. Christian Wahl-Schott
2. Gutachter	Prof. Dr. Martin Biel
Mündliche Prüfung am	16.12.2011

Meinen Eltern und meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>Einleitung</i>	9
1.1.	<i>Struktur der HCN Kanäle</i>	9
1.2.	<i>Duales gating</i>	12
1.3.	<i>Physiologische Funktionen der HCN Kanäle</i>	14
1.3.1.	<i>Rolle der HCN Kanäle für die physiologische Herzfunktion</i>	14
1.3.2.	<i>Physiologische Funktionen der HCN Kanäle im Gehirn</i>	15
1.4.	<i>Mausmodelle des HCN4 Kanals</i>	18
1.5.	<i>Ein neuer genetischer Ansatz zur Analyse der cAMP-abhängigen Modulation von HCN4</i>	20
2.	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	23
3.	<i>Material und Methoden</i>	25
3.1.	<i>Chemikalien, Lösungen und Pufferlösungen</i>	25
3.2.	<i>Arbeiten mit DNA</i>	25
3.2.1.	<i>Amplifikation und Isolation von Plasmiden</i>	25
3.2.1.1.	<i>Kultivierung von E. coli Bakterien</i>	25
3.2.1.2.	<i>Transformation von E. coli Bakterien</i>	26
3.2.1.3.	<i>Plasmidpräparation (Miniprep)</i>	26
3.2.1.4.	<i>Plasmidpräparation (Midiprep)</i>	27
3.2.1.5.	<i>Plasmidpräparation des Targeting Vektors für die Elektroporation in embryonale Stammzellen</i>	27
3.2.2.	<i>Auftrennung, Aufreinigung und Analyse von DNA</i>	27
3.2.2.1.	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	27
3.2.2.2.	<i>Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen</i>	28
3.2.2.3.	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	28
3.2.2.4.	<i>Fällung von DNA</i>	28
3.2.3.	<i>Enzymatische Modifikation von DNA</i>	29
3.2.3.1.	<i>Verdau mit Restriktionsenzymen</i>	29
3.2.3.2.	<i>Dephosphorylierung von DNA</i>	29
3.2.3.3.	<i>Ligation von DNA</i>	29
3.2.3.4.	<i>Generierung von Hilfsvektoren mit maßgeschneiderter Polyklonierungsstelle</i>	29

3.2.4. Isolierung genomischer DNA aus Gewebe von Mäusen	30
3.2.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
3.2.6. Quantifizierung von DNA	31
3.2.7. Sequenzierung von DNA	31
3.3. Gtargeting	32
3.3.1. Elektroporation	32
3.3.2. Selektion der embryonalen Stammzellen mit G418	32
3.3.3. Picken der embryonalen Stammzellen	32
3.3.4. Einfrieren der Stammzellen	32
3.3.5. Isolation genomischer DNA	33
3.3.6. Southern Blot Analyse	33
3.3.6.1. Restriktionsverdau	33
3.3.6.2. Gelelektrophorese	34
3.3.6.3. Blotting	34
3.3.6.4. Generierung radioaktiv markierter DNA-Sonden	34
3.3.6.5. Hybridisierung	35
3.4. Arbeiten mit RNA	36
3.4.1. Isolierung von RNA aus Gewebe	36
3.4.2. cDNA Synthese aus mRNA	37
3.4.3. PCR von cDNA	37
4. Ergebnisse	39
4.1. Ausarbeitung einer Gtargeting Strategie zur Mutation des HCN4 Gens	39
4.1.1. ACN Kassette	40
4.1.2. Ausarbeitung einer Southern Blot Strategie zum Nachweis der homologen Rekombination	41
4.1.3. Verifizierung der Southern Strategie mit genomischer DNA einer wildtyp Maus	42
4.2. Klonierung des Targeting Vektors	43
4.2.1. Herstellung von Hilfsvektoren	43
4.2.2. Klonierung des Targeting Vektors	44
4.2.3. Überprüfung des fertigen Targeting Vektors mittels Restriktionsverdau	51
4.2.4. Sequenzierung des fertigen Targeting Vektors	52
4.2.5. Aufreinigung des Targeting Vektors	52

4.2.6. <i>Linearisierung und Fällung des Targeting Vektors für die Elektroporation in embryonale Stammzellen</i>	53
4.3. <i>Gentargeting</i>	53
4.3.1. <i>Elektroporation</i>	53
4.3.2. <i>Selektion der embryonalen Stammzellen mit G418</i>	53
4.3.3. <i>Picken der embryonalen Stammzellen</i>	54
4.3.4. <i>Einfrieren der Stammzellen</i>	54
4.3.5. <i>Isolation genomischer DNA</i>	54
4.4. <i>Analyse der veränderten embryonalen Stammzellen</i>	54
4.4.1. <i>Southern Blot Analyse</i>	54
4.4.2. <i>Sequenzierung der genomischen DNA der embryonalen Stammzellen</i>	57
4.5. <i>Injektion der embryonalen Stammzellen</i>	59
4.6. <i>Verpaarung der Chimären</i>	60
4.7. <i>Erneutes Gentargeting zur Generierung der HCN4FEA Mauslinie</i>	60
4.8. <i>Effizienz des Gentargetings</i>	64
4.9. <i>Analyse der generierten Mauslinien</i>	64
4.9.1. <i>Genotypisierungsstrategie</i>	64
4.9.2. <i>Sequenzierung genomischer DNA der beiden generierten Mauslinien</i>	64
4.9.3. <i>Southern Blot der HCN4Y527F Mauslinie</i>	65
4.9.4. <i>Southern Blot der FEA Mauslinie</i>	66
4.9.5. <i>Southern Blot der beiden Mauslinien mit der ACN Neo Sonde</i>	66
4.9.6. <i>Nachweis des korrekten Spleißens und des Vorhandenseins der Mutationen auf mRNA Ebene durch RT-PCR</i>	68
4.9.7. <i>Genereller Phänotyp der HCN4Y527F Mauslinie</i>	69
4.9.8. <i>Genereller Phänotyp der HCN4FEA Mauslinie</i>	69
5. <i>Diskussion</i>	71
5.1. <i>Klonierung des Targeting Vektors und Gentargeting</i>	71
5.2. <i>Analyse der HCN4FEA und HCN4Y527F Mauslinien</i>	71
5.3. <i>Ausblick</i>	73
6. <i>Zusammenfassung</i>	77
7. <i>Literaturverzeichnis</i>	79
8. <i>Abkürzungsverzeichnis</i>	85
9. <i>Anhang</i>	87
9.1. <i>Verwendete Plasmide</i>	87

9.2. <i>Verwendete Primer</i>	87
9.3. <i>Verwendete modifizierte Oligonukleotide</i>	90
9.4. <i>Sequenz des Targeting Vektors</i>	91
10. <i>Lebenslauf</i>	97
11. <i>Publikationen</i>	99

1. Einleitung

Der hyperpolarisations-aktivierte Strom I_h wurde Ende der Siebziger Jahre erstmals in Sinusknotenzellen des Herzens (Noma und Irisawa 1976; Brown, DiFrancesco et al. 1979) und Neuronen (Fain, Quandt et al. 1978; Halliwell und Adams 1982) beschrieben. Es handelt sich dabei um einen Kationenstrom, getragen von Natrium- und Kaliumionen, der zur spontanen Depolarisation der Zellmembran beiträgt. Der I_h wird im Gegensatz zu den Strömen der meisten anderen spannungsabhängigen Ionenkanäle durch Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert und nicht durch deren Depolarisation. Diese besondere Eigenschaft führte zu seiner Bezeichnung als I_h (für hyperpolarisationsaktiviert), I_f (für engl. „*funny*“) oder I_q (für engl. „*queer*“), wobei I_h die heute am weitesten verbreitete Bezeichnung ist.

Erst ca. 30 Jahre nach der Entdeckung des I_h wurden die Gene der ihm zugrunde liegenden Ionenkanäle kloniert (Santoro, Grant et al. 1997; Gauss, Seifert et al. 1998; Ludwig, Zong et al. 1998; Santoro, Liu et al. 1998). Die Kanäle wurden aufgrund ihrer Eigenschaften HCN Kanäle (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) genannt, da sie durch Hyperpolarisation aktiviert werden und durch zyklische Nukleotide gesteuert werden. Sie gehören zu einer kleinen Genfamilie mit insgesamt vier Mitgliedern (HCN1-4), die sich bezüglich ihrer spannungsabhängigen Aktivierung, der Modulation durch cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) sowie der Aktivierungskinetik unterscheiden (Biel, Wahl-Schott et al. 2009).

1.1. Struktur der HCN Kanäle

HCN-Kanäle bestehen aus insgesamt vier Untereinheiten, die um die zentral gelegene Pore angeordnet sind. Es sind dabei sowohl Homo- als auch Heterotetramere aus den einzelnen Untereinheiten HCN1-4 möglich (Much, Wahl-Schott et al. 2003). Eine Untereinheit setzt sich aus insgesamt sechs Transmembranhelices (S1-S6) zusammen, wobei N- und C-Terminus intrazellulär lokalisiert sind. Die Transmembranhelix S4 stellt den Spannungssensor des Kanals dar, während die Porenschleife (*pore-loop*) zwischen den Segmenten S5 und S6 den Selektivitätsfilter für Natrium- und Kaliumionen enthält (Biel, Wahl-Schott et al. 2009). Die Aminosäuresequenz des Selektivitätsfilters der HCN Kanäle, CIGYG (Cystein-Isoleucin-Glycin-Tyrosin-Glycin) ähnelt der von Kaliumkanälen (TVGYG (Threonin-Valin-Glycin-Tyrosin-Glycin)) (Doyle, Morais Cabral et al. 1998; Zhou, Morais-Cabral et al. 2001). Außerhalb des identischen Glycin-Tyrosin-Glycin Motivs unterscheidet sich der Selektivitätsfilter von HCN- und Kaliumkanälen, was ihre verringerte K^+ -Selektivität und gleichzeitige Na^+ -Selektivität erklären könnte (Shi, Ye et al. 2006).

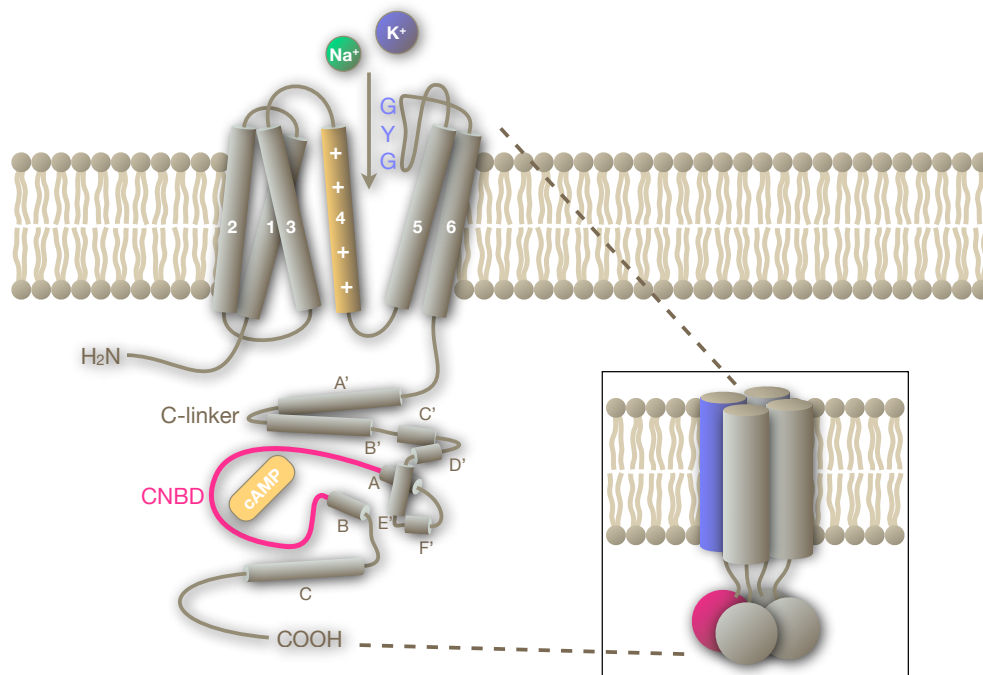


Abb. 1.1 Struktur der HCN Kanäle. HCN Kanäle bilden Tetramere. Ein Monomer besteht aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6). Der Spannungssensor befindet sich im vierten Segment (S4), die Porenregion in der Schleife zwischen S5 und S6. Die Porenregion enthält den Selektivitätsfilter mit dem GYG Motiv. Der intrazelluläre C-Terminus des Kanals setzt sich aus dem C-Linker (α -Helices A' bis F') und der CNBD (α -Helices A-C mit β -Faltblatt-Struktur (rot) zwischen Helix A und B) zusammen. (modifiziert nach (Biel, Wahl-Schott et al. 2009))

Wie die nahe verwandten CNG-Kanäle (*cyclic nucleotide-gated channels*) besitzen auch HCN-Kanäle eine C-terminale Bindungsdomäne für die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP. Die Struktur der cAMP-Bindungsdomäne (CNBD, *cyclic nucleotide binding domain*) sowie des C-Linkers, der die CNBD mit dem S6 Segment des Kanal verbindet, ist durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden (Zagotta, Olivier et al. 2003; Xu, Vysotskaya et al. 2010; Lolicato, Nardini et al. 2011).

Der C-Linker besteht aus sechs α -Helices (A' bis F'), die durch kurze Schleifen verbunden sind. Die CNBD enthält vier α -Helices (A, P, B und C) und ein β -Faltblatt (in sogenannter *jelly-roll-like* Topologie) mit insgesamt acht β -Strängen zwischen den Helices A und B. Die P-Helix befindet sich zwischen β -Strang sechs und sieben (Abb. 1.1 und Abb. 1.2).

Die C-Termini der HCN-Kanäle lagern sich als Tetramer mit einer vierfachen Rotationsachse zusammen, die der vorhergesagten tetrameren Struktur der HCN-

Kanäle entspricht (Abb. 1.1). Die Interaktion der C-terminalen Domänen der vier Kanaluntereinheiten untereinander erfolgt über den C-Linker. Die ersten beiden Helices (A' und B') einer Untereinheit bilden ein antiparalleles Helix-Schleife-Helix Motiv, das mit der dritten und vierten Helix (C' und D') der benachbarten Untereinheit interagiert. Die Interaktion erfolgt dabei über Salzbrücken (Craven und Zagotta 2004).

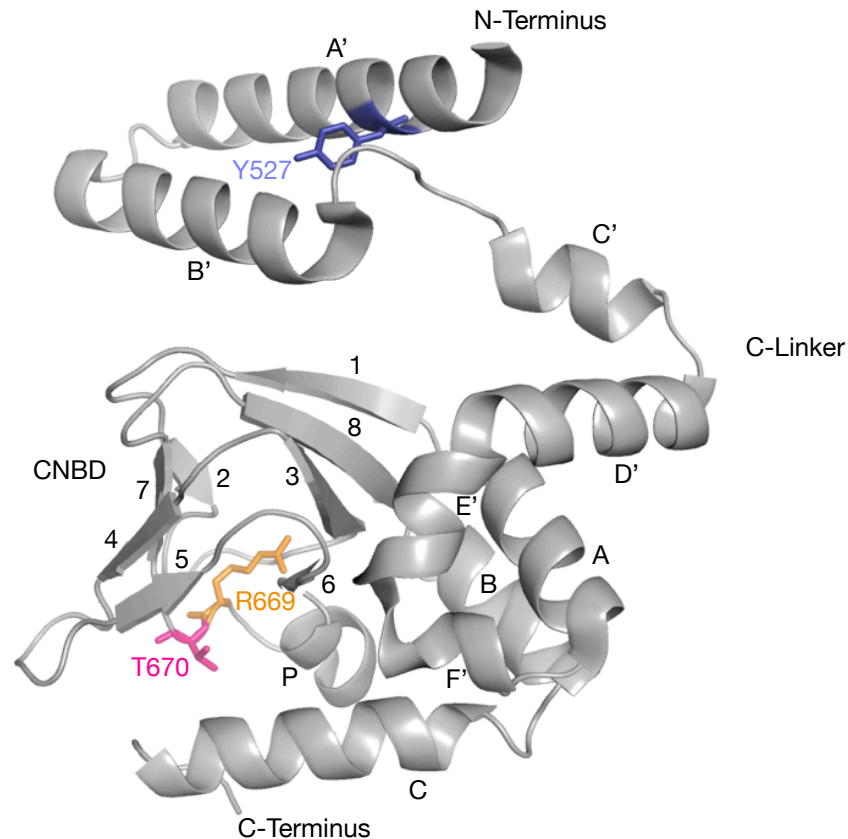


Abb. 1.2 Dreidimensionale Struktur des C-Terminus einer Untereinheit des humanen HCN4 Kanals. Die in der vorliegenden Arbeit mutierten Aminosäuren Tyrosin (Y527, blau) sowie Arginin (R669, orange) und Threonin (T670, rot) sind hervorgehoben. Röntgenkristallstruktur modifiziert nach (Xu, Vysotskaya et al. 2010)

Die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP binden innerhalb des β -Faltblattes und interagieren zudem mit der C-Helix. cAMP bindet dabei in der *anti* Konfiguration, während cGMP in der *syn* Konfiguration bindet. Wichtig für die Bindung von cAMP ist dabei die Interaktion mit den Aminosäuren Arginin (R591 in mHCN2 bzw. R669 in hHCN4 und mHCN4) sowie Threonin (T592 in mHCN2 bzw. T670 in hHCN4 und mHCN4), die sich zwischen den β -Faltblättern 2 und 3 der CNBD befinden (Abb. 1.3) (Zagotta, Olivier et al. 2003). HCN Kanäle mit Punktmutationen von Arginin zu Glut-

amat bzw. Glutamin (R669E bzw. R669Q) und von Threonin zu Alanin (T670A) zeigen keine cAMP-abhängige Modulation mehr.

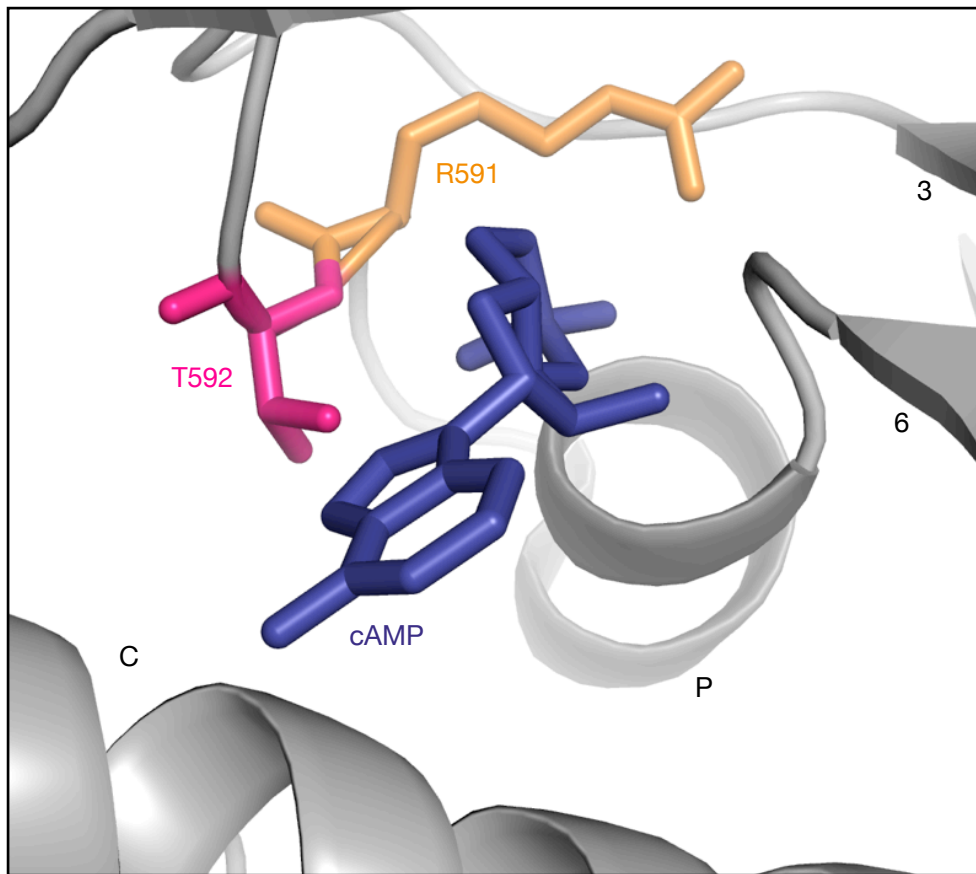


Abb. 1.3 Ausschnitt der dreidimensionalen Struktur der CNBD des murinen HCN2 Kanals in Anwesenheit von cAMP. Die hervorgehobenen Aminosäuren Arginin (R591, orange) und Threonin (T592, rot) entsprechen den Aminosäuren R669 und T670 des murinen HCN4 Kanals. cAMP bindet zwischen dem β -Faltblatt und der C-Helix. Der Ribose-Rest interagiert ausschließlich mit dem β -Faltblatt, primär über elektrostatische Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrücken zwischen dem Phosphat-Rest und den Aminosäuren Arginin 591 und Threonin 592. Der Purin-Rest interagiert sowohl mit dem β -Faltblatt als auch mit der C-Helix. Röntgenkristallstruktur modifiziert nach (Zagotta, Olivier et al. 2003).

1.2. Duales gating

Das sogenannte *gating* bezeichnet den Öffnungsmechanismus von Ionenkanälen. Spannungsabhängige Ionenkanäle besitzen einen Spannungssensor, der vom S4 Segment gebildet wird, welches mehrere positiv geladene Aminosäuren wie Arginin oder Lysin

enthält (Yu und Catterall 2004). Veränderungen des Membranpotentials bewirken, dass sich der Spannungssensor innerhalb der Zellmembran nach innen (bei Hyperpolarisation) bzw. außen (bei Depolarisation) bewegt. Diese spannungsabhängigen Bewegungen übertragen sich auf den S4-S5 Linker, was zum Öffnen bzw. Schließen des Kanals führt (Jiang, Lee et al. 2003; Long, Campbell et al. 2005a; Long, Campbell et al. 2005b).

HCN Kanäle werden bei Membranhyperpolarisation durch Bewegung des Spannungssensors nach innen geöffnet, wohingegen sie bei Depolarisation durch Bewegung des Spannungssensors nach außen geschlossen werden. Im Gegensatz dazu führt bei allen anderen bekannten spannungsabhängigen Kationenkanälen die Bewegung des Spannungssensors nach innen zum Schließen des Kanals und die Bewegung nach außen zum Öffnen des Kanals (Mannikko, Elinder et al. 2002). Der genaue Mechanismus für dieses gegensätzliche Verhalten ist bislang ungeklärt.

Zyklische Nukleotide bewirken ohne Vorliegen einer Hyperpolarisation der Zellmembran keine Öffnung des Kanals. Vielmehr führt die Bindung von cAMP zur Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen und somit zur erleichterten spannungsabhängigen Aktivierung des Kanals (DiFrancesco und Tortora 1991). Während das Ausmaß der Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve für beide zyklischen Nukleotide gleich ist, ist die Affinität von cAMP ($K_a = 60\text{-}500\text{ nM}$) um den Faktor 10 bis 100 höher als für cGMP ($K_a = 6\text{ }\mu\text{M}$) (Ludwig, Zong et al. 1998).

In Abwesenheit von cAMP stabilisiert die C-terminale Domäne (C-Linker und CNBD) den geschlossenen Zustand der HCN Kanäle. Bindung des Liganden cAMP führt zu einer Konformationsänderung in der CNBD unter Einbeziehung der C-Helix. Diese Konformationsänderung ist gekoppelt an eine Konformationsänderung des C-Linkers. Die Konformationsänderung des C-Linkers einer Untereinheit überträgt sich auf die benachbarte Untereinheit, wodurch der sogenannte *gating ring* des Kanaltetramers eine Konformationsänderung eingeht, welche sich auf das S6 Segment überträgt. Man kann sich diese Konformationsänderung wie die Öffnung der Blende einer Kamera vorstellen. Die offene Konformation des Kanals ist dann energetisch bevorzugt (Ulens und Siegelbaum 2003; Zagotta, Olivier et al. 2003). In der von Zagotta et al. veröffentlichten Kristallstruktur befindet sich der C-Linker in der Ruhe-Konformation, während sich die CNBD in der aktiven (cAMP-gebundenen) Konformation befindet. Nach einem modularen *gating* Modell kann jede Domäne (Kanalpore, C-Linker und CNBD) somit unabhängig von den anderen Domänen in zwei unterschiedlichen Konformationen vorkommen. Durch die Interaktion untereinander beeinflussen sich die einzelnen Domänen gegenseitig. Die Aktivierung einer Domäne wirkt sich auf die anderen Domänen aus und beeinflusst damit die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals (Craven und Zagotta 2004).

Da das *duale gating* durch Hyperpolarisation und cAMP-Modulation stets gleichzeitig auftritt, lassen die beiden Effekte sich pharmakologisch, z.B. durch Inhibition des Kanals, nicht unabhängig voneinander untersuchen.

1.3. Physiologische Funktionen der HCN Kanäle

HCN Kanäle werden in verschiedenen Geweben exprimiert, darunter vor allem im Herzen sowie im Gehirn. Die physiologischen Funktionen, die ihnen zugeschrieben werden, werden in den folgenden Unterkapiteln detailliert beschrieben.

1.3.1. Rolle der HCN Kanäle für die physiologische Herzfunktion

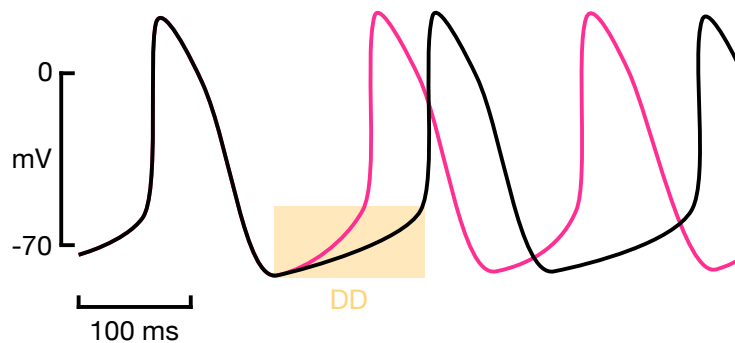
HCN Kanäle werden im Herzen vor allem in Schrittmacherzellen des Sinusknotens, sowie in Zellen des Erregungsleitungssystems und des Arbeitsmyokards exprimiert (Shi, Wymore et al. 1999; Moosmang, Stieber et al. 2001; Fenske, Mader et al. 2011). In allen bislang analysierten Spezies ist HCN4 für ca. 80 % des I_h im Sinusknoten verantwortlich (Stieber, Herrmann et al. 2003; Herrmann, Stieber et al. 2007). Für die restlichen 20 % des sinoatrialen I_h ist in der Maus und im Menschen zum größten Teil HCN2 verantwortlich (Shi, Wymore et al. 1999; Ludwig, Budde et al. 2003). Im Gegensatz zu früheren Arbeiten wurde in einer kürzlich erschienenen Publikation eine signifikante Expression von HCN1 im Sinusknoten gefunden (Herrmann, Layh et al. 2011).

Der Herzschlag wird durch die spontane Depolarisation von Sinusknotenzellen generiert. Das Aktionspotential dieser Zellen (Schrittmacherpotential) zeichnet sich durch eine langsame diastolische Depolarisation des Membranpotentials ausgehend von ca. -70 mV bis -45 mV aus. Die diastolische Depolarisation sorgt dafür, dass das Schwellenpotential für die Öffnung von T- und L-Typ Calciumkanälen erreicht wird, wodurch ein Aktionspotential ausgelöst wird. Der Ausstrom von Kaliumionen führt schließlich wieder zur Hyperpolarisation der Zellmembran und die diastolische Depolarisation beginnt erneut (Abb. 1.4). Dieser Mechanismus ist die Grundlage für die Autorhythmie des Sinusknotens (Mangoni und Nargeot 2008).

Die diastolische Depolarisation entsteht durch das Zusammenspiel verschiedener Ströme, von denen dem I_h eine wichtige Rolle zugeschrieben wird, da er bei Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert wird und einen depolarisierenden Einwärtsstrom leitet (DiFrancesco 2010). Neben dem I_h tragen auch Calciumströme ($I_{Ca,T}$ und $I_{Ca,L}$) (Hagiwara, Irisawa et al. 1988; Stieber, Hofmann et al. 2004; Mangoni, Couette et al. 2006; Mangoni und Nargeot 2008) sowie der *sustained inward current* (I_{st}) (Mitsuiye, Shinagawa et al. 2000) zur Entstehung der diastolischen Depolarisation im Sinusknoten bei (Hagiwara, Irisawa et al. 1988; Stieber, Hofmann et al. 2004; Mangoni, Couette et al. 2006; Mangoni und Nargeot 2008). Darüber hinaus könnte die Abnahme der auswärts-

gleichrichtenden Kaliumströme I_{Kr} und I_{Ks} sowie die Calciumfreisetzung durch Ryano-
din- (Lakatta, Vinogradova et al. 2002; Lakatta, Maltsev et al. 2003; Vinogradova,
Lyashkov et al. 2006) oder Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3)-Rezeptoren (Mery, Aimond
et al. 2005) an der diastolischen Depolarisation beteiligt sein.

Das vegetative Nervensystem reguliert die Herzfrequenz über das Hormon Adrenalin
sowie die Neurotransmitter Noradrenalin und Acetylcholin. Beta-adrenerge Stimulation
durch Adrenalin oder Noradrenalin erhöht die intrazelluläre cAMP Konzentration, der I_h
wird verstärkt, wodurch die diastolische Depolarisation beschleunigt wird und die Herz-
frequenz steigt (Abb. 1.4) (Brown, DiFrancesco et al. 1979; Brown, DiFrancisco et al.
1979; DiFrancesco und Tortora 1991). Umgekehrt führt ein erhöhter Tonus des Pa-
rasympathikus zur Abnahme der cAMP Konzentration und somit zur Herzfrequenzab-
nahme (DiFrancesco und Tromba 1988a; DiFrancesco und Tromba 1988b; DiFrancesco,
Ducouret et al. 1989).



*Abb. 1.4 Schematische Darstellung von Aktionspotentialen des Sinusknotens
ohne (schwarze Kurve) und mit beta-adrenerger Stimulation (rote Kurve).
Nach beta-adrenerger Stimulation erfolgt die diastolische Depolarisation
(DD) schneller, wodurch es zum Anstieg der Herzfrequenz kommt.*

1.3.2. Physiologische Funktionen der HCN Kanäle im Gehirn

Alle vier HCN Kanäle werden im Gehirn exprimiert, jedoch mit regional unterschiedli-
cher Expressionsdichte und -verteilung. HCN1 wird in Neokortex, Hippocampus,
Kleinhirnrinde und Hirnstamm exprimiert. HCN2 wird nahezu ubiquitär in allen Ge-
hirnregionen exprimiert, mit der höchsten Expression im Thalamus und Hirnstamm.
HCN3 wird im Hypothalamus, olfaktorischen Bulbus, Hippocampus sowie in niedrige-
rer Expressionsdichte im Kortex exprimiert. HCN4 wird vor allem in verschiedenen
Kernen des Thalamus sowie im olfaktorischen Bulbus stark exprimiert (Moosmang,
Biel et al. 1999; Santoro, Chen et al. 2000; Notomi und Shigemoto 2004; Mistrík, Ma-
der et al. 2005).

HCN Kanälen werden im Gehirn verschiedene Funktionen zugeschrieben, unter anderem bei der denritischen Integration, im räumlichen Arbeitsgedächtnis, bei der Steuerung der Langzeit-Potenzierung (LTP) im Hippocampus, beim Lernen motorischer Prozesse, bei der Neurotransmission und bei verschiedenen Resonanz- und Oszillations-Prozessen (Biel, Wahl-Schott et al. 2009). Darüber hinaus spielen HCN Kanäle eine wichtige Rolle bei der Generierung synchronisierter Oszillationen in Neuronen des Thalamus (McCormick und Bal 1997).

In vitro Ergebnisse aus Experimenten mit Gehirnschnitten zeigen, dass der I_h in bestimmten Neuronen, z.B. thalamischen Relais-Neuronen als Schrittmacher fungiert (McCormick und Pape 1990). Der I_h trägt durch spontane Depolarisation des Membranpotentials zum spontanen Feuern dieser Neurone bei. Expressions-Studien zeigten, dass HCN4 in signifikantem Maße im Thalamus exprimiert wird (Moosmang, Biel et al. 1999; Moosmang, Stieber et al. 2001; Notomi und Shigemoto 2004). Daher ist davon auszugehen, dass HCN4 am I_h in thalamischen Neuronen beteiligt ist.

Das Aktivitätsmuster von Neuronen des thalamo-kortikalen Netzwerks unterscheidet sich zwischen Schlaf- und Wachzustand (Abb. 1.5A).

Der Non-REM Schlaf ist durch das Auftreten von langsamen δ -Wellen (0,5 Hz bis 4 Hz) sowie Spindel-Wellen (7 Hz bis 14 Hz) im Elektroenzephalogramm (EEG) gekennzeichnet. Ursache dafür sind rhythmische Oszillationen des Membranpotentials von Neuronen des thalamo-kortikalen Systems. Diese Oszillationen entstehen durch das Zusammenspiel verschiedener Ionenkanäle. HCN Kanäle, die bei Hyperpolarisation des Membranpotentials geöffnet sind, führen zu einer Depolarisation und damit zur Öffnung von T-Typ Calciumkanälen. Der Calcium-Einstrom bewirkt durch weitere Depolarisation die Aktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle, wodurch es zur Auslösung einer Salve an schnellen Aktionspotentialen kommt. Durch die Depolarisation deaktivieren die HCN Kanäle, das Membranpotential hyperpolarisiert wieder. Die erneute Hyperpolarisation führt wieder zur Öffnung der HCN Kanäle sowie der T-Typ Calciumkanäle und der gesamte Prozess beginnt von neuem (Abb. 1.5B). Man nennt diesen Modus aufgrund der schnellen Aktionspotential-Salven auch *burst firing* Modus. Diese rhythmischen Oszillationen der thalamo-kortikalen Relais-Neurone dämpfen eingehende sensorische Signale, sodass der Kortex während des Schlafes von sensorischen Informationen abgeschirmt wird (McCormick und Bal 1997).

Während des Wachzustandes und REM (*rapid eye movement*) Schlafphasen ist die Zellmembran thalamischer Relais-Neurone hingegen depolarisiert. T-Typ Calciumkanäle liegen dann inaktiviert vor, HCN Kanäle sind deaktiviert. Die Neurone feuern im sogenannten *Transmission* Modus (Abb. 1.5C), wodurch die Weiterleitung afferenter Sinnessignale vom Thalamus an den Kortex ermöglicht wird.

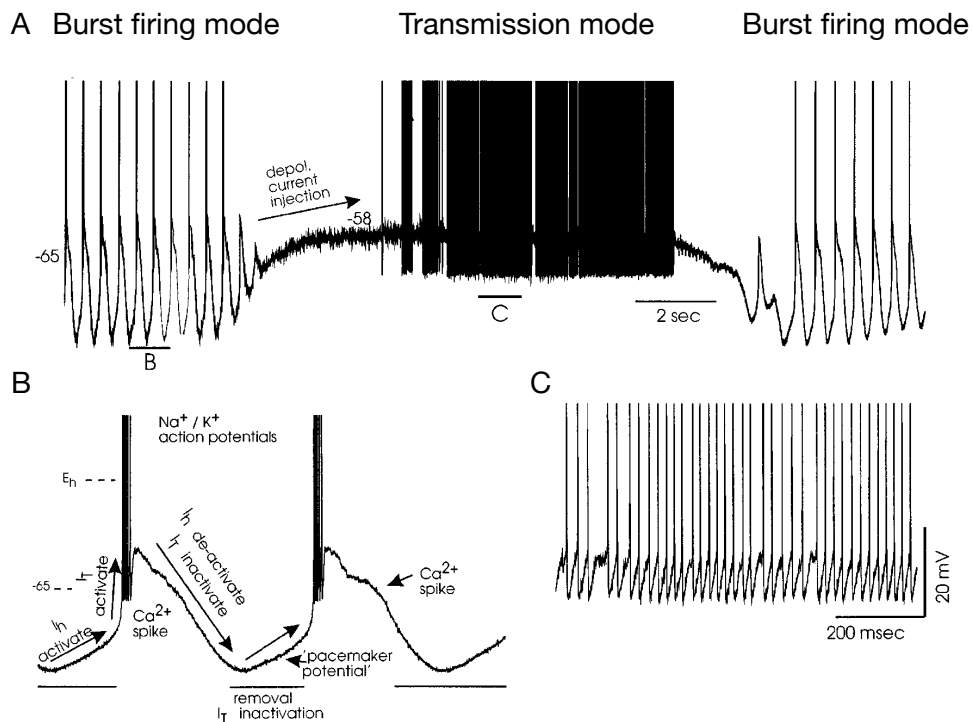


Abb. 1.5 Aktivitätsmuster thalamo-kortikaler Neurone. A, Ein Neuron feuert zunächst oszillierende Aktionspotentiale (“burst firing mode”) mit einer Frequenz von ca. 2 Hz. Depolarisation des Neurons auf -58 mV durch Injektion eines Stromes stoppt die rhythmischen Oszillationen. Das Neuron feuert jetzt Aktionspotentiale im sogenannten “Transmission mode”. Ursache dafür ist die Inaktivierung des T-Typ Calciumkanalstroms I_T bei positiveren Membranpotentialen. Die erneute Hyperpolarisation stellt die ursprünglichen Oszillationen wieder her. B, Vergrößerte Ansicht der oszillatorischen Aktivität des Neurons. Öffnung von HCN Kanälen (I_h) und T-Typ Calciumkanälen (I_T) führt zur Depolarisation, es kommt zur Aktivierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen (I_{Na}), die im Zusammenspiel mit Kaliumkanälen (I_K) eine Salve von Aktionspotentialen auslösen. Die Depolarisation bewirkt ihrerseits die Deaktivierung des I_h sowie Inaktivierung des I_T . Es kommt erneut zur Hyperpolarisation, wodurch der I_h wieder aktiviert und der I_T de-inaktiviert wird. Die Depolarisation beginnt von neuem. C, Vergrößerte Ansicht der Aktivität im “transmission mode”. Abbildung modifiziert nach (McCormick und Bal 1997).

Elektrophysiologische Experimente legen nahe, dass die Regulation des thalamo-kortikalen I_h durch das Adenylzyklase/cAMP System eine kritische Rolle bei der Generierung langsamer periodischer Oszillationen während des Tiefschlafs spielt (Lüthi und McCormick 1998). Diese sind wichtig für die synaptische Plastizität des thalamo-korti-

kalen Netzwerks (Steriade und Timofeev 2003). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass der Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration und daraus resultierend die Verstärkung des I_h zusammen mit anderen Faktoren den Übergang vom Tiefschlaf in den REM Schlaf bzw. in den Wachzustand vermittelt (McCormick und Bal 1997). Dieser Übergang wird durch die Neurotransmitter Noradrenalin und Serotonin vermittelt, welche beide einen Anstieg der cAMP Konzentration bewirken.

1.4. Mausmodelle des HCN4 Kanals

HCN4 KO Maus (Stieber, Herrmann et al. 2003)

Mäuse mit einer globalen Deletion des HCN4 Kanals sterben bereits während der Embryonalentwicklung zwischen Tag E9,5 und E11,5 der Schwangerschaft. Die Herzfrequenz von *knockout* Embryonen ist im Vergleich zu wildtyp Embryonen signifikant langsamer und kann auch nicht durch cAMP erhöht werden. Die fehlende Differenzierung der *knockout* Sinusknotenzellen zeigt sich darin, dass diese auch nach Tag E9,0 nur embryonale Aktionspotentiale generieren, während Sinusknotenzellen von wildtyp Embryonen ab Tag E9,0 "reife" Schrittmacherpotentiale bilden können. HCN4 ist folglich während der Embryonalentwicklung essentiell für die Ausbildung von Schrittmacherpotentialen im entstehenden Sinusknoten.

Induzierbare Deletion von HCN4 im Mausmodell (Herrmann, Stieber et al. 2007)

Mäuse bei denen der HCN4 Kanal erst im Erwachsenenalter durch konditionellen *knockout* deletiert wurde überleben, im Gegensatz zur zuvor beschriebenen Mauslinie, bei der der Kanal bereits während der Embryonalentwicklung deletiert ist. Die Mäuse zeigen charakteristische Arrhythmien, die sich in wiederkehrenden Sinuspausen äußern. Interessanterweise zeigen die konditionellen erwachsenen KO Mäuse keine Einschränkung der Herzfrequenzregulation nach Stimulation des Sympathikus. Die Autoren folgern daraus, dass HCN4 für die Aufrechterhaltung eines stabilen Sinus-Rhythmus, nicht aber für die Herzfrequenzregulation notwendig ist.

Mauslinie mit cAMP-insensitivem HCN4 Kanal (HCN4^{R669Q}) (Harzheim, Pfeiffer et al. 2008)

Die von Harzheim et al. beschriebene Mauslinie trägt eine Punktmutation in der CNBD (Arginin nach Glutamin (R669Q); Zur Bedeutung dieser Punktmutation siehe auch Kapitel 1.1 sowie Abb. 1.2 und Abb. 1.3). Diese Punktmutation bewirkt, dass der Kanal insensitive gegenüber der Modulation mit cAMP (in physiologischen Konzentrationen) wird. Ähnlich wie globale KO Mäuse sterben auch homozygote HCN4^{R669Q/R669Q} Embryonen während der Embryonalentwicklung zwischen Tag E11 und E12. Heterozygote HCN4^{R669Q/+} Embryonen zeigen verringerte Herzfrequenzen sowie keine bzw. eine abgeschwächte Reaktion nach Stimulation mit Catecholaminen. Heterozygote erwachsene

Mäuse zeigen in Ruhe und unter körperlicher Belastung normale Herzfrequenzen, entwickeln jedoch Sinuspausen bzw. einen sinoatrialen Block nach beta-adrenerger Stimulation. Die cAMP-abhängige Modulation von HCN4 ist also für die Schrittmacherfunktion des Sinusknotens im embryonalen Herzen essentiell. Da die Mutation bereits während der Embryonalentwicklung letal ist, konnte die cAMP-abhängige Modulation von HCN4 nicht an homozygoten erwachsenen Mäusen analysiert werden.

Tamoxifen-induzierbare Deletion von HCN4 im Erregungsleitungssystem (Hoesl, Stieber et al. 2008)

Die Deletion im Erregungsleitungssystem wurde durch induzierbare Cre-vermittelte Exzision des HCN4 Gens erreicht. Dabei wurde eine Cre-Mauslinie verwendet, bei der das Cre-Gen unter der Kontrolle des nativen HCN4 Promotors steht. Somit erfolgt die Deletion nur in HCN4 exprimierenden Zellen. Weshalb es nach Induktion mit Tamoxifen lediglich im Erregungsleitungssystem und nicht im Gehirn zum HCN4 *knockout* kommt, ist nicht geklärt. Die Erregungsleitungs-spezifischen, induzierbaren HCN4 KO Mäuse zeigen einen den globalen induzierbaren HCN4 KO Mäusen (Herrmann, Stieber et al. 2007) vergleichbaren kardialen Phänotyp mit unveränderter basaler Herzfrequenz und dem Auftreten von Sinus-Pausen.

Transgene hHCN4-573x Mauslinie (Alig, Marger et al. 2009)

Die humane HCN4-573X Mutation führt zu HCN4 Kanälen mit verkürztem C-Terminus ohne CNBD. Dies führt zum Verlust der cAMP-abhängigen Modulation des I_h , da die Mutation einen dominant negativen Effekt auf die anderen Kanalisformen hat. Patienten mit der Mutation zeigen eine Sinusknotendysfunktion sowie chronotrope Inkompetenz (Schulze-Bahr, Neu et al. 2003). Die beschriebene transgene Mauslinie mit induzierbarer herzspezifischer Expression der humanen HCN4 Mutation (hHCN4-573X) zeigt einen den Patienten vergleichbaren Phänotyp mit basaler Bradykardie und erniedrigter maximaler Herzfrequenz. Die generelle Herzfrequenzregulation in erwachsenen hHCN4-573X Mäusen ist nicht eingeschränkt. Die cAMP-abhängige Modulation des I_h ist folglich zwar für die Aufrechterhaltung einer gewissen Grundfrequenz, sowohl in Ruhe als auch unter Belastung notwendig, nicht aber für die Herzfrequenzregulation an sich.

Spezifische, induzierbare Ablation von Zellen des Erregungsbildungs- und -leitungssystems (Herrmann, Fabritz et al. 2011)

Durch induzierbare, auf das Erregungsbildungs- und -leitungssystem beschränkte Expression des Diphtherie Toxins A wurde in diesem Mausmodell eine selektive Schädigung von Schrittmacherzellen erreicht. Die Mäuse entwickelten eine Bradykardie, veränderte Reaktion auf beta-adrenerge Stimulation sowie Sinusarrhythmien und -pausen. Der Phänotyp der Mäuse ist dem von Patienten mit *sick sinus syndrome* vergleichbar.

Induzierbare herzspezifische Deletion von HCN4 (Baruscotti, Bucchi et al. 2011)

Mit Ausnahme der konstitutiven HCN4 KO Maus (Stieber, Herrmann et al. 2003) zeigen die anderen HCN4 KO Modelle nur milde Effekte auf die kardiale Automatie sowie keine Änderung der Herzfrequenzregulation (Herrmann, Stieber et al. 2007; Hoesl, Stieber et al. 2008). In diesem Mausmodell hingegen führt die herzspezifische Deletion von HCN4 in erwachsenen Mäusen zu progressiver schwerer Bradykardie sowie atrio-ventrikulärem Block, was schließlich zum Herzstillstand und Tod der Mäuse nach ca. fünf Tagen führt. Woher die Unterschiede zwischen dieser und den früher publizierten Linien stammen, ist ungeklärt. Eine mögliche Erklärung sind die unterschiedlichen verwendeten Promotoren der Cre-Mauslinien. Lediglich die von Baruscotti et al. publizierte Cre-Mauslinie verwendete einen herzspezifischen (α MHC) Promotor, wohingegen die anderen Mauslinien einen ubiquitären CAGG-Promotor (Herrmann, Stieber et al. 2007) verwendeten, bzw. das Cre-Gen unter Kontrolle des nativen HCN4 Promotors stand.

1.5. Ein neuer genetischer Ansatz zur Analyse der cAMP-abhängigen Modulation von HCN4

Zu Beginn dieser Arbeit war die Rolle der cAMP-abhängigen Modulation von HCN4 für die physiologische Funktion des Herzens und des Gehirns in der erwachsenen Maus nicht bekannt, da in nativen Zellen die cAMP- und spannungsabhängige Regulation von HCN Kanälen stets gleichzeitig stattfindet. Mit Hilfe klassischer Methoden, wie pharmakologischer Blockade des Kanals oder globalen bzw. gewebespezifischen KO Mausmodellen, können die cAMP- und spannungsabhängigen Effekte auf das *gating* der HCN Kanäle nicht unabhängig voneinander untersucht werden. Die Rolle der cAMP-abhängigen Regulation von HCN4 in der erwachsenen Maus konnte bisher lediglich in einem transgenen Mausmodell einer humanen Mutation des HCN4 Kanals untersucht werden. Die transgene Expression von hHCN4-573X führt zu HCN4 Kanälen mit verkürztem C-Terminus ohne CNBD (Alig, Marger et al. 2009).

Es ist bislang keine *knock-in* Mauslinie verfügbar, bei der die cAMP-abhängige Modulation des murinen HCN4 Kanals in erwachsenen Mäusen untersucht werden kann. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, sterben homozygote HCN4^{R669Q} Mäuse bereits während der Embryonalentwicklung, wohingegen heterozygote Mäuse lebensfähig sind. Die halbmaximale Aktivierungsspannung des I_h in Kardiomyocyten heterozygoter HCN4^{R660Q} Embryonen liegt zwischen den Werten der wildtyp bzw. homozygoten Mäuse (Tabelle 1.1). Die halbmaximale Aktivierungsspannung homozygoter Mäuse liegt mit -95,7 mV negativ des physiologischen Potentialbereichs, wodurch der Kanal unter physiologischen Bedingungen kaum im aktiven Zustand vorliegt. Dies entspricht einem funktio-

nellen “knockout” des Kanals und könnte die embryonale Letalität erklären (Harzheim, Pfeiffer et al. 2008).

Tabelle 1.1 Halbmaximale Aktivierungsspannung ($V_{0,5}$) des I_h in Kardiomyocyten der $HCN4^{R669Q}$ Mauslinie.

<i>Genotyp</i>	<i>$V_{0,5}$ [mV]</i>
<i>$HCN4^{+/+}$</i>	-82,5
<i>$HCN4^{R669Q/+}$</i>	-89,3
<i>$HCN4^{R669Q/R669Q}$</i>	-95,7

Um das Problem der embryonalen Letalität cAMP insensitiver HCN4 Kanäle zu umgehen, wurden in einem heterologen Expressionssystem durch unsere Arbeitsgruppe weitere Punktmutationen im Bereich des C-Linkers von HCN4 analysiert, welche eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung des Kanals zu positiveren Potentialen und somit in den physiologischen Potentialbereich bewirken könnten. Als Ausgangskonstrukt diente ein cAMP insensitiver HCN4 Kanal, dessen CNBD die Punktmutationen R669E (Arginin zu Glutamat) und T670A (Threonin zu Alanin) trägt. Zur Funktion der mutierten Aminosäuren siehe auch Kapitel 1.1 sowie Abb. 1.2 und Abb. 1.3. Aufgrund dieser Analyse wurde festgestellt, dass der Austausch eines Tyrosin-Restes durch Phenylalanin (Y527F) in der A' Helix des C-Linkers zu HCN4 Kanälen führt, die die erforderlichen elektrophysiologischen Eigenschaften aufweisen. Insbesondere führte dieser Aminosäureaustausch zu einer Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung um ca. 10 mV hin zu positiveren Potentialen (Abb. 1.7 und Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2 Halbmaximale Aktivierungsspannungen ($V_{0,5}$) verschiedener hHCN4 Konstrukte ohne und mit 1 mM cAMP. (Die Anzahl der gemessenen Zellen ist jeweils in Klammern angegeben)

<i>Konstrukt</i>	<i>$V_{0,5}$ [mV]</i>	
	<i>ohne cAMP</i>	<i>mit cAMP [1 mM]</i>
<i>hHCN4 WT</i>	-96,5 ± 1,7 (6)	-76,1 ± 3,8 (5)
<i>hHCN4 RT_EA</i>	-97,3 ± 2,4 (6)	-95,1 ± 2,0 (8)
<i>hHCN4 YRT_FEA</i>	-87,2 ± 3,0 (7)	-86,9 ± 1,5 (9)

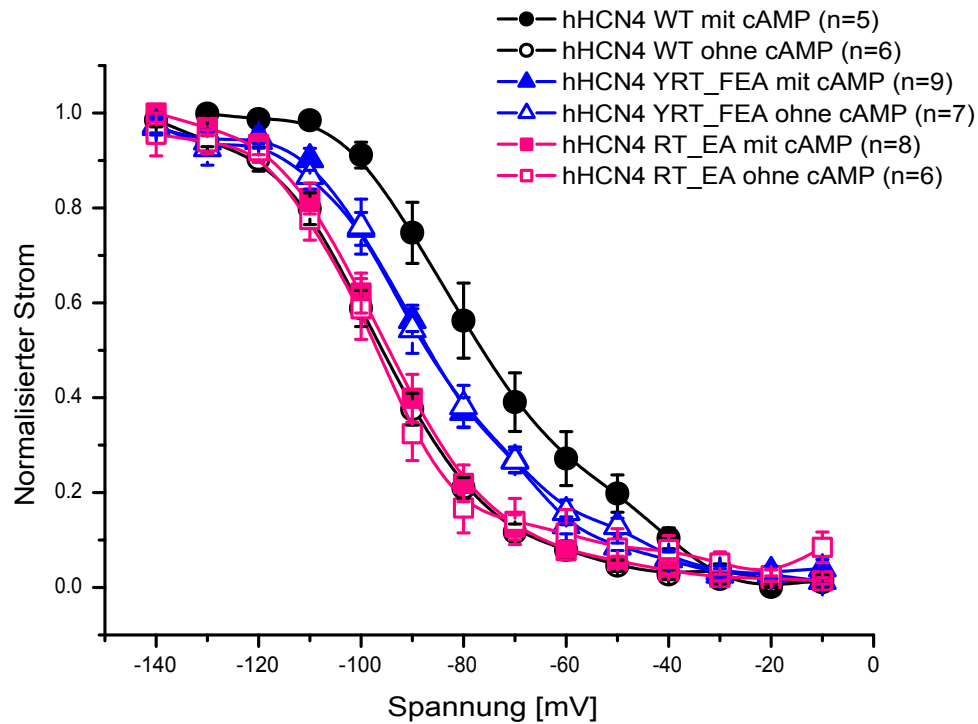


Abb. 1.7 Aktivierungskurven des humanen HCN4 Kanals sowie der mutierten HCN4 Kanäle, exprimiert in HEK293 Zellen in Anwesenheit von 1 mM cAMP (ausgefüllte Symbole) und ohne cAMP (offene Symbole).

Die halbmaximale Aktivierungsspannung der hHCN4 YRT/FEA Konstrukte (-87,2 mV) liegt zwischen den Werten der WT Mäuse (-82,5 mV) und denen der heterozygoten HCN4^{R669Q/+} Mäuse (-89,3 mV) und somit im physiologischen Potentialbereich. Möglicherweise wird deshalb die embryonale Herzentwicklung in Mäusen mit der dreifachen Mutation HCN4 Y527F/R669E/T670A (HCN4^{FEA}) normal verlaufen.

2. Zielsetzung der Arbeit

Zur Untersuchung der cAMP-abhängigen Regulation des Schrittmacherkanals HCN4 in erwachsenen Mäusen sollte eine neue genetisch veränderte Mauslinie (HCN4^{FEA}) generiert werden. Mäuse dieser Linie tragen drei Punktmutationen im HCN4 Gen (Y527F, R669E und T670A). Die Mutationen R669E und T670A liegen in der CNBD und führen zum Verlust der cAMP-abhängigen Modulation des HCN4 Kanals.

Mäuse einer ähnlichen Linie mit alleiniger Mutation der CNBD (HCN4^{R669Q}) sterben bereits während der Embryonalentwicklung. Die halbmaximale Aktivierungsspannung ($V_{0,5}$) des I_h der HCN4^{R669Q} Mauslinie liegt mit -95,7 mV außerhalb des physiologischen Potentialbereiches (Harzheim, Pfeiffer et al. 2008). Dies ist möglicherweise eine Erklärung für die Letalität während der Embryonalentwicklung.

Um das Problem der embryonalen Letalität zu umgehen, sollte in der vorliegenden Arbeit eine weitere Mutation (Y527F) in den C-Linker des Kanals eingefügt werden. Diese Mutation führt zu einer Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung des Kanals um ca. 10 mV zu positiveren Potentialen und somit in den physiologischen Potentialbereich. Möglicherweise wird diese zusätzliche Mutation die normale Funktion des HCN4 Kanals und somit eine normale embryonale Entwicklung des Herzens ermöglichen.

Zur Generierung der HCN4^{FEA} Mauslinie sollte zunächst ein Targeting Vektor kloniert werden, der die gewünschten Mutationen, sowie eine Resistenzkassette zur Selektion der embryonalen Stammzellen während des folgenden Gtargetings enthält.

Nach Fertigstellung des Targeting Vektors sollte ein klassisches Gtargeting an embryonalen Stammzellen von Mäusen, gefolgt von der Analyse auf korrekte Integration des Targeting-Konstrukts durchgeführt werden. Nach Generierung chimärer Mäuse aus den ES Zellen und Verpaarung mit wildtyp Mäusen sollten die Nachfahren auf korrekte Integration des Targeting Konstruktes sowie das Vorhandensein der Mutationen auf genomischer sowie mRNA Ebene überprüft werden.

Sollten homozygote HCN4^{FEA/FEA} Mäuse lebensfähig sein, wird dies erstmals die Analyse der cAMP-abhängigen Modulation von HCN4 Kanälen der Maus für die physiologische Funktion von Herz und Gehirn ermöglichen.

3. Material und Methoden

Die molekularbiologischen Methoden sind dem Buch “Molekular Cloning: A Laboratory Manual” der Autoren Sambrook und Russell entnommen (Sambrook und Russell 2001). Teilweise wurden die entsprechenden Protokolle etwas modifiziert.

Bei sämtlichen Methoden wurde, soweit nicht anders angegeben, nach den Anweisungen des Herstellers verfahren.

3.1. Chemikalien, Lösungen und Pufferlösungen

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, über die Firmen Biorad, Merck, Perkin-Elmer, Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Es wurde dabei stets die Qualität “pro analysi” bzw. “für molekularbiologische Zwecke” bestellt. Zur Herstellung von Lösungen wurde ultrafiltriertes und mittels UV-Oxidation/Entkeimung behandeltes DNase- und RNase-freies Reinstwasser aus einer Anlage der Firma Werner (Easypure UF/UV, Werner GmbH, Leverkusen, Deutschland) verwendet. Für sehr sensitive Methoden wie der Kultur embryonaler Stammzellen und Arbeiten mit genomischer DNA wurden die Lösungen nach der Herstellung autoklaviert.

3.2. Arbeiten mit DNA

3.2.1. Amplifikation und Isolation von Plasmiden

In dieser Arbeit wurden verschiedene Plasmide zur Klonierung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Eine Übersicht der verwendeten Plasmide befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

3.2.1.1. Kultivierung von E. coli Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten kompetenten Escherichia coli Bakterien vom Stamm XL1 Blue MRF wurden von der Firma Stratagene (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bezogen.

Kultiviert wurden die Bakterien bei 37 °C entweder in Suspensionskultur in autoklaviertem Luria Bertani Medium mit Glucose (LB+ Medium) oder auf LB+ Agarplatten in Gegenwart eines geeigneten Antibiotikums (Ampicillin 100 µg/ml).

<i>LB+ Medium</i>		<i>LB+ Agar</i>	
<i>Pepton</i>	<i>10 g</i>	<i>Pepton</i>	<i>15 g</i>
<i>Hefeextrakt</i>	<i>5 g</i>	<i>LB+ Medium</i>	<i>ad 1000 ml</i>
<i>NaCl</i>	<i>5 g</i>		
<i>Glucose</i>	<i>1 g</i>		
<i>H₂O</i>	<i>ad 1000 ml</i>		
<i>pH Wert 7,2 bis 7,5</i>			

3.2.1.2. Transformation von *E. coli* Bakterien

Bei der Transformation handelt es sich um das Einbringen fremder Plasmid-DNA in Bakterien. Dies erfolgte mittels Hitzeschock nach dem Protokoll von Sambrook und Russel (Sambrook und Russell 2001). Zunächst wurde pro Transformationsansatz ein 100 μ l Aliquot der kompetenten *E. coli* Bakterien in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis aufgetaut. Dann wurden 15 μ l des Ligationsansatzes bzw. bei einer Retransformation 10 ng Plasmid-DNA zu den Zellen pipettiert, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Für den anschließenden Hitzeschock wurde das 1,5 ml Reaktionsgefäß für genau 45 s einem Wasserbad bei 42 °C ausgesetzt und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 900 μ l LB+ Medium, gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 225 rpm. Nach der Inkubation wurden die Bakterien auf mit einem geeigneten Antibiotikum versehenen LB+ Agarplatten ausgestrichen (Ampicillin 100 μ g/ml) und anschließend über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.1.3. Plasmidpräparation (Miniprep)

Nach dem Ausstrich und der anschließenden Inkubation über Nacht wurden zur Analyse der einzelnen gewachsenen Bakterienkolonien eine Plasmidpräparation im kleinen Maßstab durchgeführt (Miniprep). Dazu wurden einzelne Bakterienkolonien in je 7 ml LB+ Medium mit geeignetem Antibiotikum (Ampicillin 100 μ g/ml) Schüttelinkubator über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Bakterien bei 2000 x g für 10 min abzentrifugiert und eine Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse nach Sambrook und Russell durchgeführt (Sambrook und Russell 2001). Um die Bakterienklone zu identifizieren, die das korrekte Plasmid enthielten, wurde anschließend mit der isolierten Plasmid-DNA eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

3.2.1.4. Plasmidpräparation (Midiprep)

Für einige Klonierungsschritte wurde Plasmid-DNA in größerer Menge und Reinheit benötigt. Zu diesem Zweck wurde ein Bakterienklon in 200 ml LB+ Medium inklusive geeignetem Antibiotikum (Ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$) über Nacht bei 37 °C und 225 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) nach den Hersteller-vorschriften. Zur Überprüfung der Identität und Reinheit der erhaltenen Plasmid-DNA wurde anschließend eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

3.2.1.5. Plasmidpräparation des Targeting Vektors für die Elektroporation in embryonale Stammzellen

Da für die Durchführung des Gtargetings DNA von sehr hoher Reinheit und in relativ großer Menge benötigt wurde, wurde der Targeting Vektor mittels des “Large Construct Kit” (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Vorgegangen wurde nach den Angaben des Herstellers.

Dazu wurden 500 ml LB Medium (ohne Glucose) mit dem entsprechenden Bakterienklon angeimpft, anschließend über Nacht bei 37 °C und 225 rpm im Schüttelinkubator inkubiert und am nächsten Morgen lysiert. Das Protokoll beruht auf einer klassischen alkalischen Lyse, gefolgt von einer DNA-Präzipitation und Aufreinigung mittels Säulenchromatographie. Zusätzlich wurden eventuell vorhandene Verunreinigungen mit bakterieller genomischer DNA mittels einer ATP-abhängigen Exonuklease verdaut. Das am Ende erhaltene DNA Pellet wurde in 100 μl TE Puffer gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

<i>TE Puffer</i>	
<i>1 M Tris, pH 8</i>	<i>5 ml</i>
<i>0,5 M EDTA, pH 8</i>	<i>1 ml</i>
<i>H₂O</i>	<i>ad 500 ml</i>

3.2.2. Auftrennung, Aufreinigung und Analyse von DNA

3.2.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, PCR-Produkten etc. wurden Agarose-Gele mit einer Konzentration von 0,7 % (für Fragmente größer 800 bp) bis 2 % (für Fragmente kleiner 800 bp) Agarose in TBE Puffer verwendet. Die Auftrennung erfolgte in TBE Puffer in horizontalen Gelkammern bei 100 V bis 150 V. Vor dem Auftragen wurde dem DNA-Gemisch der Ladepuffer zugegeben, der zur Visualisierung der Migration im Gel die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylenolcyanol enthält. Die Visualisierung der DNA

durch UV-Licht (GelDoc, Biorad, München, Deutschland) wurde durch dem Gel in einer Konzentration von 800 ng/ml zugefügten Ethidiumbromid ermöglicht. Zum Größenvergleich der DNA-Fragmente wurde jeweils ein Größenstandard (1 kb DNA Ladder, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland; oder Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) mit aufgetragen.

<i>Gel-Ladepuffer (6x Dye)</i>		<i>10x TBE</i>	
<i>10x TBE</i>	60 %	<i>Tris</i>	0,9 M
<i>Ficoll Typ 400</i>	18 %	<i>Borsäure</i>	0,9 M
<i>EDTA pH 8,0</i>	0,12 mM	<i>EDTA pH 8,0</i>	20 mM
<i>Bromphenolblau</i>	0,15 %		
<i>Xylenolcyanol FF</i>	0,15 %		

3.2.2.2. Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen diente das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

3.2.2.3. Phenol-Chloroform-Extraktion

Zum Abtrennen von Salzen, Verunreinigungen, Enzymen etc. aus DNA- oder RNA-Lösungen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die jeweilige Lösung wurde ad 300 µl mit Wasser verdünnt, anschließend 300 µl Roti-Phenol Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben, 10 s lang gut gemischt und anschließend für 1 min bei 13200 rpm abzentrifugiert. Die obere (wässrige) Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, anschließend 300 µl Chloroform hinzugegeben, wieder für 10 s gut gemischt und 1 min bei 13200 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde die obere (wässrige Phase inkl. DNA bzw. RNA) in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA gefällt (s. nachfolgendes Kapitel).

3.2.2.4. Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA wurde die jeweilige Lösung mit dem 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und dem zweieinhalbfachen Volumen Ethanol (99% Vol/Vol) versetzt und der Ansatz für 10 min bei -80 °C inkubiert. Anschließend wurde die gefällte DNA bei 13200 rpm bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNA mit Ethanol (70% Vol/Vol) gewaschen. Anschließend wurde erneut bei 13200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA Pellet anschließend in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Heraeus, Hanau, Deutschland) getrocknet. Die getrocknete DNA wurde anschließend im gewünschten Volumen Wasser gelöst.

3.2.3. Enzymatische Modifikation von DNA

Zur enzymatischen Modifikation von DNA wurden Enzyme der Firmen Roche, New England Biolabs und Fermentas eingesetzt. Das Vorgehen richtete sich nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers.

3.2.3.1. Verdau mit Restriktionsenzymen

Die Reaktionsbedingungen richteten sich nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers des Restriktionsenzym.

3.2.3.2. Dephosphorylierung von DNA

Um zu verhindern, dass es bei der Ligation von DNA Fragmenten zur Re-Ligation des Vektors kommt, wurden dessen 5'-DNA-Enden nach dem Restriktionsverdau dephosphoryliert. Die Ligase benötigt zum Verknüpfen der Enden der DNA die 5'-Phosphatgruppe der DNA. Fehlt diese, wird eine Ligation verhindert. Eingesetzt wurde die Calf intestine phosphatase (New England Biolabs) oder das "Rapid DNA Dephos & Ligation Kit" der Firma Roche. Vorgegangen wurde nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers.

3.2.3.3. Ligation von DNA

Um DNA Fragmente (Inserts) in einen zuvor aufgeschnittenen und dephosphorylierten Vektor einzubauen wurde entweder die T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) oder das "Rapid DNA Dephos & Ligation Kit" (Roche) verwendet.

3.2.3.4. Generierung von Hilfsvektoren mit maßgeschneiderter Polyklonierungsstelle

Für die Klonierung des Targeting Vektors wurden diverse Hilfsvektoren mit jeweils maßgeschneiderter Polyklonierungsstelle benötigt. Als Ausgangspunkt diente der Vektor pBlueskript II SK (-) (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Aus diesem wurde mittels BssHII die komplette Polyklonierungsstelle herausgeschnitten und die Enden des verbleibenden Vektors dephosphoryliert. Zur Generierung einer maßgeschneiderten Polyklonierungsstelle wurden die benötigten Restriktionsschnittstellen geplant und zwei zueinander komplementäre synthetische Oligonukleotide (CGHV1for und CGHV1rev) bestellt (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland). Damit die synthetischen Oligonukleotide auch mit dem dephosphorylierten Vektor ligiert werden konnten, wurden sie vom Hersteller zusätzlich jeweils am 5' Ende mit einer Phosphatgruppe modifiziert. Bei der Planung wurde darauf geachtet, dass die nach der Zusammenlagerung der beiden zueinander komplementären Oligonukleotide entstehenden überhängenden Enden jeweils die Sequenz der BssHII-Schnittstelle aufwiesen. Je 50 µl der synthetischen Oligonukleotide (Konzentration je 1 pmol/µl) wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt, bei 75 °C denaturiert und anschließend in einem Be-

cherglas, das Wasser der Temperatur 75 °C enthielt, langsam abgekühlt. Dabei lagerten sich die jeweils zueinander komplementären Oligonukleotide zusammen. Anschließend wurden die zusammengelagerten Oligonukleotide mit dem zuvor mit BssHII geschnittenen und dephosphorylierten Vektor ligiert.

3.2.4. Isolierung genomischer DNA aus Gewebe von Mäusen

Zur Isolierung genomischer DNA aus dem Gewebe von Mäusen wurde das jeweilige Gewebe (meist ein ca. 1 mm bis 5 mm langes Stück Schwanzspitze) mit dem Enzym Proteinase K verdaut. Dazu wurde zum jeweiligen Gewebe je 100 µl Proteinase K Mix (99 µl Proteinase K Puffer + 1 µl Proteinase K (20 mg/ml, Roche)) gegeben und der Ansatz über Nacht bei 55 °C und 600 rpm im Thermomixer (Eppendorff, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K für 20 min bei 99 °C inaktiviert und die Ansätze bei 4 °C gelagert.

<i>Proteinase K Puffer</i>	
<i>Tris</i>	<i>100 mM</i>
<i>EDTA</i>	<i>5 mM</i>
<i>SDS</i>	<i>0,2</i>
<i>NaCl</i>	<i>200 mM</i>

3.2.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden diverse PCRs durchgeführt. Für die Genotypisierung von Mäusen wurde eine Taq-Polymerase verwendet. Für PCRs bei denen eine Polymerase mit “Proofreading-Funktion” (Ausbesserung von Lesefehlern) benötigt wurde, kam das Enzym “Phusion DNA Polymerase” (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) zum Einsatz.

Zum Einfügen der Punktmutationen in den Targeting Vektor diente das “QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit” (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die Reaktionsbedingungen richteten sich jeweils nach den Empfehlungen des Herstellers.

Standard PCR Ansatz für Taq DNA Polymerase

DNA	$x \mu l$
10x Taq Buffer	2,5 μl
forward Primer (10 pmol/ μl)	1,25 μl
reverse Primer (10 pmol/ μl)	1,25 μl
dNTPs (1,25 mM)	4 μl
Taq DNA Polymerase	0,25 μl
H ₂ O	ad 25 μl

PCR-Programm zur Genotypisierung der HCN4 Mauslinien

$T[^\circ C]$	$t[s]$	
95	300	
95	30	↓
60	30	40 Zyklen
72	30	↓
72	300	
10	--	

Standard PCR Ansatz für Phusion DNA Polymerase

DNA	$x \mu l$
5x Phusion HF Buffer	10 μl
forward Primer (10 pmol/ μl)	2,5 μl
reverse Primer (10 pmol/ μl)	2,5 μl
dNTPs (10 mM)	1,0 μl
Taq-Polymerase	0,5 μl
H ₂ O	ad 50 μl

PCR-Programm für Phusion DNA Polymerase

$T[^\circ C]$	$t[s]$	
98	30	
98	10	↓ 35 Zyklen
72	x	↓ ($x=30 s$ pro 1 kb)
72	420	
10	--	

3.2.6. Quantifizierung von DNA

Die Konzentration wässriger DNA-Proben wurde photometrisch bei einer Absorptionswellenlänge von 260 nm ermittelt (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Eine optische Dichte (OD₂₆₀) von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm einer DNA-Menge von 50 $\mu g/\mu l$ doppelsträngiger DNA.

3.2.7. Sequenzierung von DNA

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) und GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte nach den Anforderungen der Firmen.

3.3. Gentargeting

Sämtliche Arbeiten der embryonalen Stammzellkultur wurden in den Labors von Prof. Dr. Reinhard Fässler unter Leitung von Dr. Markus Moser am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) nach einem etablierten Protokoll durchgeführt (Talts, Brakebusch et al. 1999). Die Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien kann vorgeanntem Protokoll entnommen werden. Im folgenden werden die wichtigsten Schritte kurz beschrieben.

3.3.1. Elektroporation

Nach der Linearisierung wurden ca. 60 μg des Targeting Vektors in 4×10^7 embryonale Stammzellen vom Stamm 129/Sv elektroporiert und diese anschließend auf Feeder Zellen in Petri-Schalen in ES-Zell Medium ausgesät.

3.3.2. Selektion der embryonalen Stammzellen mit G418

24 Stunden nach dem Aussäen der embryonalen Stammzellen wurde mit der Selektion begonnen. Dazu wurde das normale ES-Zell Medium durch ES-Zell Medium ausgetauscht, dem das Aminoglykosid Antibiotikum Geneticin (G418) zugesetzt wurde. Zellen, welche das Targeting-Konstrukt und somit die ACN Kasette in ihr Genom integriert haben, sind resistent gegenüber Geneticin, während alle anderen Zellen abgetötet werden. Bis die einzelnen Stammzellkolonien eine ausreichende Größe erreicht hatten, wurde das ES-Zell Medium (+G418) täglich gewechselt. Nach ca. einer Woche konnte mit dem Picken der einzelnen Klone begonnen werden.

3.3.3. Picken der embryonalen Stammzellen

Ca. eine Woche nach der Elektroporation wurden je durchgeführtem Gentargeting 360 Stammzellklone unter dem Stereomikroskop gepickt, trypsiniert und diese anschließend in 24-Well Platten in ES-Zell Medium (+G418) ausgesät. Bis zum Erreichen einer ausreichenden Zelldichte wurden die Stammzellen einige Tage kultiviert, bevor mit dem Einfrieren begonnen werden konnte.

3.3.4. Einfrieren der Stammzellen

Ca. drei bis fünf Tage nach der Isolation der Stammzellklone wurde ein Aliquot jedes Klons für die spätere Blastozysten-Injektion weggefroren. Dazu wurden die Zellen in den 24-Well Platten trypsiniert, das jeweilige Well mit 1 ml Einfrier-Medium aufgefüllt, anschließend 700 μl der Lösung in Cryo-Röhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Der im Well verbleibende Teil der Stammzellen wurde so lange in ES-Zell Medium weiter kultiviert, bis die Nährstoffe des Mediums aufgebraucht waren.

3.3.5. Isolation genomischer DNA

Nachdem die Nährstoffe des ES-Zell Mediums aufgebraucht waren, wurden die Stammzellen in den 24-Well Platten mit Proteinase K lysiert und anschließend die genomische DNA mit Hilfe von Isopropanol gefällt. Die jeweils entstehende DNA Flocke wurde in ein Reaktionsgefäß mit 150 μ l TE Puffer überführt und die DNA anschließend bei 55 °C über Nacht im Brutschrank gelöst. Am nächsten Morgen wurden die Reaktionsgefäße zum vollständigen Lösen der genomischen DNA über einen Reaktionsgefäßständer "geratscht". Die isolierte genomische DNA diente im Anschluss für die Southern Blot Analyse.

3.3.6. Southern Blot Analyse

Mittels Southern Blot Analyse (Southern 1975) lassen sich genau definierte DNA Fragmente in einem Gemisch verschiedener DNA-Fragmente nachweisen. Dazu wird zunächst (genomische) DNA mit einem Restriktionsenzym verdaut und die entstehenden DNA-Fragmente anschließend mittels klassischer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA-Fragmente werden vom Gel auf eine Membran übertragen (Blot) und diese anschließend mit einer, dem nachzuweisenden DNA-Fragment komplementären radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Die spezifische DNA-Sonde bindet dabei an ihr komplementäres Stück DNA welches sich anschließend durch Autoradiographie nachweisen lässt.

Lösungen für den Southern-Blot:

<u>20x SSC</u>		<u>Church Puffer</u>	
<i>NaCl</i>	350,6 g	<i>BSA</i>	5 g
<i>Na₃Citrat-dihydrat</i>	176,4 g	<i>H₂O</i>	50 ml
<i>H₂O</i>	ad 2,0 l	<i>1 M Na₂HPO₄</i>	193,5 ml
		<i>1 M NaH₂PO₄</i>	56,6 ml
<i>ssDNA 10 mg/ml</i>		<i>20 % SDS</i>	175 ml
<i>Salmon Sperm DNA</i>	500 mg	<i>0,5 M EDTA pH 8</i>	1 ml
<i>H₂O</i>	ad 50 ml	<i>ssDNA</i>	5 ml
		<i>H₂O</i>	ad 500 ml

3.3.6.1. Restriktionsverdau

Je 10 μ l bis 15 μ l der genomischen DNA der ES-Zellen wurde mit dem jeweiligen Restriktionsenzym in einem 50 μ l Ansatz über Nacht verdaut.

3.3.6.2. Gelelektrophorese

Am nächsten Morgen wurden die Reaktionsansätze auf ein 0,6 % Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch bei 100 V für 6 bis 9 Stunden (je nach Größe der DNA-Fragmente) aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht zusammen mit einem Lineal fotografiert, da der DNA Größenstandard später nicht durch die radioaktiv markierte DNA-Sonde visualisiert werden kann.

Anschließend wurde das Gel für 10 min in 0,2 M HCl in einer Metallwanne geschwenkt. Dies ist notwendig, um durch partielle Depurinierung Strangbrüche in der DNA zu induzieren und dadurch den Transfer großer DNA-Fragmente auf die Membran zu erleichtern. Zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge wurde das Gel 30 min in 0,5 M Natronlauge/1,5 M Natriumchlorid geschwenkt und anschließend für 30 min in 0,5 M Tris pH 8/3 M NaCl neutralisiert.

3.3.6.3. Blotting

Im Anschluss an die Depurinierung, das Denaturieren und die Neutralisation des Gels wurde die DNA mittels Southern Blot auf eine Nylonmembran (Genescreen Plus, Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland) transferiert. Dazu wurde das Gel auf einen mit 10x SSC getränkten Schwamm, der mit einem Filterpapier bedeckt war, gelegt. Der Schwamm befand sich in einer mit 10x SSC gefüllten Wanne. Die Membran wurde auf das Gel gelegt, auf die Membran ein weiteres Filterpapier gelegt und auf den gesamten Aufbau ein Stapel Saugpapier gelegt. Dieser wurde mit einem Gewicht beschwert. Die entstehenden Kapillarkräfte bewirken einen vertikalen Flüssigkeitsstrom, der die DNA nach oben auf die Membran transportiert. Der gesamte Blotting-Prozess dauert 12 bis 18 Stunden.

Anschließend wurde die DNA durch zweiminütige Bestrahlung mit UV-Licht (CI-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP, Upland, CA, USA; Strahlungsenergie 120 mJ/cm²) kovalent auf der Membran gebunden und die Membran anschließend bei Raumtemperatur auf einem Filterpapier getrocknet.

3.3.6.4. Generierung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Sämtliche radioaktive Arbeiten wurden in einem für das Isotop α -³²P zugelassenen Isotopenlabor hinter Plexiglas-Schutzscheiben durchgeführt. Dies ist als Schutzmaßnahme ausreichend, da die emittierte β -Strahlung durch wenige Zentimeter Plexiglas effektiv abgeschirmt wird.

Als Ausgangsprodukt für die Generierung der radioaktiv markierten DNA-Sonden dienten jeweils dem nachzuweisenden DNA-Fragment homologe PCR-Produkte von 600 bp bis 800 bp Größe. Diese wurden durch PCR mit genspezifischen Primern (siehe An-

hang) generiert und über Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Isolierung aus dem Gel aufgereinigt.

Je 200 ng DNA pro Sonde wurde mit dem “Random Primed DNA Labeling Kit” der Firma Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland) radioaktiv markiert. Das Herstellerprotokoll wurde etwas modifiziert. Die radioaktiv zu markierende DNA wurde ad 14,0 μ l mit Wasser verdünnt und anschließend bei 99 °C denaturiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz wie folgt zusammenpipettiert. Das radioaktiv markierte [α -³²P]dCTP wurde von Perkin Elmer (Rodgau, Deutschland) bezogen.

Anschließend wurde der Reaktionsansatz über eine Sephadex Säule (Nick Column, GE Healthcare, München, Deutschland) aufgereinigt. Das Prinzip beruht auf der Größenausschlusschromatographie, wonach die ungebundenen Nukleotide von der markierten Sonde aufgrund des Größenunterschieds getrennt werden können. Der Reaktionsansatz wurde auf eine zuvor mit TE Puffer äquilibrierte Säule pipettiert und sofort 360 μ l TE Puffer auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen (Fraktion 1). Anschließend wurde für die weiteren Fraktionen einmal 400 μ l (Fraktion 2; diese Fraktion enthält die radioaktiv markierte Sonde) und anschließend viermal je 250 μ l (Fraktionen 3 bis 6) TE Puffer auf die Säule pipettiert und das Eluat jeweils in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Von allen Fraktionen wurde je ein 2 μ l Aliquot in einem Szintillationszähler (LS 6500, Beckman, Krefeld, Deutschland) vermessen. Die Aktivität der markierten Sonden lag hierbei meist zwischen 150000 cpm/ μ l und 400000 cpm/ μ l.

<i>Reaktionsansatz</i>	
<i>DNA (ca. 100 ng)</i>	<i>14 μl</i>
<i>dNTP Mixture (dATP, dGTP, dTTP; je 0,5 mM)</i>	<i>6 μl</i>
<i>Reaction Mix</i>	<i>4 μl</i>
<i>[α-³²P]dCTP (800 Ci/mmol; 10 mCi/ml)</i>	<i>14 μl</i>
<i>Klenow Enzyme</i>	<i>2 μl</i>
<i>Inkubation für 60 min bei 37 °C im Heizblock</i>	

3.3.6.5. Hybridisierung

Bevor mit der Hybridisierung begonnen werden konnte, wurde die Membran in eine hitzebeständige, verschließbare Hybridisierungsrolle gegeben und für drei Stunden mit Church Puffer bei 60 °C bei eingeschaltetem Rotor in einem Hybridisierungssofen (Compact Line OV4, Biometra, Göttingen, Deutschland) prähybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Dies ist notwendig, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, da sonst die DNA-Sonde auch unspezifisch an die

Membran binden würde. Die einzusetzende Menge der zuvor radioaktiv markierte DNA Sonde wurde berechnet. Je nach Membran-Größe wurde eine Gesamt-Aktivität pro Membran zwischen $1,0 \times 10^7$ und $1,25 \times 10^7$ cpm eingesetzt. Die entsprechende Menge Sonde wurde ad 200 μ l mit TE Puffer verdünnt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel im Wasserbad bei 100 °C für 10 min denaturiert. Die denaturierte Sonde wurde anschließend in die Hybridisierungsrolle mit der prähybridisierten Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte in 15 ml Church Puffer bei 60 °C und eingeschaltetem Rotor über Nacht im Hybridisierungssofen.

Am nächsten Tag wurde unspezifisch gebundene und überschüssige Sonde durch mehrere Waschschrte (je 30 min; je einmal in 2x SSC/0,1 % SDS bei 62 °C, in 0,4x SSC/0,1 % SDS bei 68° C und in 0,4x SSC/0,1 % SDS bei 70 °C) entfernt. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie eingepackt und eine Phosphor-Imaging-Platte (BAS-MP 2040S, Fujifilm) für 4 bis 16 Stunden aufgelegt. Die Phosphor-Imaging-Platte wurde anschließend in einem speziellen Lesegerät (BAS Reader 1500, Fujifilm) ausgelesen und mit geeigneter Software (BAS Reader, Fujifilm; TINA, Raytest) ausgewertet.

3.4. Arbeiten mit RNA

Bei Arbeiten mit RNA muss stets darauf geachtet werden, dass die Proben nicht mit RNAsen (RNA abbauende Enzyme) in Kontakt kommen. Da diese z.B. auf menschlicher Haut vorkommen, wurden die Arbeitsflächen, Geräte sowie insbesondere die Handschuhe vor dem Arbeiten mit RNase Away (M&P Molecular Bio Products) behandelt. Da RNAsen auch durch Autoklavieren bei 121 °C nicht zerstört werden können, wurden Glaswaren für 2 h bei 200 °C gebacken. Wasser wurde durch die Zugabe von 0,01 % DEPC (Diethylpyrocarbonat) und Inkubation für 16 Stunden von RNAsen befreit. Durch anschließendes zweimaliges Autoklavieren wurde das DEPC zersetzt.

3.4.1. Isolierung von RNA aus Gewebe

Zum Gewebe (1/2 Gehirn einer Maus) wurde je 100 mg Gewebe 1 ml Trizol Lösung (PeqGold Trifast, Peqlab, Erlangen, Deutschland) gegeben. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Abweichend davon wurde das Gewebe durch mehrmaliges Aufziehen in einer Spritze und jeweils anschließende Passage durch eine Kanüle homogenisiert. Die isolierte RNA wurde in DEPC Wasser gelöst und die Konzentration photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

3.4.2. cDNA Synthese aus mRNA

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem ThermoScript RT-PCR System (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers.

3.4.3. PCR von cDNA

Zur Untersuchung der mRNA Expression von HCN4 in den verschiedenen Mauslinien wurde von der generierten cDNA eine PCR mit spezifischen Primern (s. Anhang) durchgeführt. Zur Kontrolle der eingesetzten cDNA Menge wurde ebenfalls eine PCR mit GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; wichtiges Enzym der Glykolyse) spezifischen Primern (s. Anhang) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach folgendem Protokoll. Anschließend wurde zur Überprüfung der Identität und Reinheit je 1,0 μ l pro PCR Ansatz auf ein 1 % Agarose Gel aufgetragen.

Für die anschließende Sequenzierung wurden die PCR-Produkte mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit" aufgereinigt. Die Probenvorbereitung erfolgte nach den Vorgaben der Firma Eurofins MWG Operon.

<i>Standard PCR Ansatz für Phusion DNA</i>		<i>PCR-Programm für Phusion DNA</i>	
<i>Polymerase zur cDNA Amplifikation</i>		<i>Polymerase</i>	
<i>cDNA Template</i>	<i>1 μl</i>	<i>T[°C]</i>	<i>t[s]</i>
<i>5x Phusion HF Buffer</i>	<i>10 μl</i>	98	30
<i>forward Primer (10 pmol/μl)</i>	<i>2,5 μl</i>	98	10 35 Zyklen(HCN4) bzw.
<i>reverse Primer (10 pmol/μl)</i>	<i>2,5 μl</i>	72	40 20 Zyklen(GAPDH)
<i>dNTPs (10 mM)</i>	<i>1,0 μl</i>	72	420
<i>Taq-Polymerase</i>	<i>0,5 μl</i>	10	--
<i>H₂O</i>	<i>ad 50 μl</i>		

4. Ergebnisse

4.1. Ausarbeitung einer Gentergeting Strategie zur Mutation des HCN4 Gens

Zum gezielten Einfügen der geplanten Mutationen in das murine HCN4 Gen wurde eine Gentergeting Strategie ausgearbeitet. Der erste Schritt bei der Generierung von *knock-in* Mäusen ist dabei die Konstruktion eines Targeting Vektors. Ein klassischer Targeting Vektor enthält ein Resistenzgen für ein bestimmtes Antibiotikum, welches als positiver Selektionsmarker dient. Flankiert wird die Resistenzkassette von homologen Bereichen des Gens, das verändert werden soll. Diese homologen Bereiche des Targeting Vektors werden für die homologe Rekombination, bei der die endogene DNA durch das Targeting Konstrukt ersetzt wird, benötigt. Martin Evans, Oliver Smithies und Mario Capecchi, die 2007 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet wurden, sind die Wegbereiter dieser Technik. Evans etablierte die embryonale Stammzellkultur (Evans und Kaufman 1981), Smithies zeigte, dass es möglich ist, Plasmid DNA in das chromosomale Genom einer menschlichen Zelle einzufügen (Smithies, Gregg et al. 1985), während Capecchi das Gentergeting mittels homologer Rekombination in Säugerzellen etablierte (Thomas, Folger et al. 1986). Begünstigt wird die homologe Rekombination mit zunehmender Länge der flankierenden Sequenzen (Deng und Capecchi 1992). Embryonale Stammzellen, bei denen das Targeting Konstrukt integriert wurde, tragen die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum und können so einfach selektioniert werden (Talts, Brakebusch et al. 1999). Die homologe Rekombination in Säugetierzellen ist jedoch ein sehr seltenes Ereignis. In den meisten Fällen finden die Rekombinationsereignisse heterolog statt, d.h. die embryonalen Stammzellen integrieren das Targeting Konstrukt an zufälliger Stelle in ihr Genom (Bollag, Waldman et al. 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Targeting Vektor entworfen, der den Bereich der Exons 4 bis 7 des murinen HCN4 Gens umfasste. Zusätzlich sollte der Targeting Vektor am 5'- und 3'-Ende homologe Sequenzbereiche enthalten, die für die homologe Rekombination nötig sind. Darüber hinaus sollte eine Resistenz-Kassette (ACN Kassette) in das Intron 4 eingefügt werden, um die Selektion derjenigen murinen embryonalen Stammzellen zu ermöglichen, bei denen das Targeting Konstrukt mittels homologer Rekombination in das Genom integriert wurde. In das Exon 4 sollte eine Punktmutation eingefügt werden, die dafür sorgt, dass die spannungsabhängige Aktivierungskurve des Kanals zu positiveren Potentialen verschoben wird. Die Punktmutationen im Exon 7 führen zur Insensitivität des Kanals gegenüber der Modulation durch die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP.

4.1.1. ACN Kasette

Als Antibiotikums-Resistenzkassette zur Selektion der veränderten embryonalen Stammzellen wurde in dieser Arbeit die sogenannte ACN Kasette eingesetzt. Die von Michaeline Bunting (Bunting, Bernstein et al. 1999) entworfene ACN Kasette (Abb. 4.1) ermöglicht sowohl die Selektion der veränderten embryonalen Stammzellen, als auch die selbständige Exzision der Kasette aus dem Genom der Spermien der männlichen chimären Mäuse.

Die Sequenz der Kasette enthält die Geninformation der Cre Rekombinase, welche unter der Kontrolle des Testis-spezifischen Angiotensin-converting Enzyme (ACE) steht. Dieser Promotor ist nur in Spermien aktiv, wodurch die Deletion der Kasette in der männlichen Keimbahn, nicht jedoch in den embryonalen Stammzellen von Mäusen erfolgen kann. Um die Transkription und anschließende selbst-Exzision der Kasette in Bakterien zu verhindern, enthält das Cre Gen ein Intron des SV-40 t-Antigens. Die Kasette enthält außerdem die Geninformation für die Neomycin Phosphotransferase, um die Selektion der veränderten embryonalen Stammzellen mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin (G418) zu ermöglichen. Die Expression der Neomycin-Resistenz (Neo^r) steht unter der Kontrolle des RNA Polymerase II Promotors. Die Sequenz der Kasette ist am 5' und am 3' Ende von loxP Seiten flankiert. Während der Spermatogenese induziert der tACE-Promotor die Expression der Cre Rekombinase, welche die loxP Seiten erkennt und die ACN Kasette aus dem Genom der Spermien ausschneidet (Orban, Chui et al. 1992; Gu, Marth et al. 1994). Nach der Cre-vermittelten Exzision verbleibt eine einzelne loxP Seite im Genom (Bunting, Bernstein et al. 1999).



Abb. 4.1 Schematische Darstellung der ACN Kasette mit loxP Seiten (grüne Dreiecke), tACE Promotor (tACE), Cre Rekombinase (Cre), RNA Polymerase II Promotor (Pol II) und Neomycin Phosphotransferase (Neo). (modifiziert nach (Bunting, Bernstein et al. 1999))

Da die Möglichkeit besteht, dass es bei der Transkription des HCN4 Gens in den embryonalen Stammzellen zu einem “readthrough” und somit zur Transkription der Cre kommt, wurde die ACN Kasette in der vorliegenden Arbeit in inverser transkriptioneller Orientierung in den HCN4 Genloкус integriert. Dadurch kann verhindert werden, dass die ACN Kasette bereits in den embryonalen Stammzellen aus dem Genom deletiert wird. Das in dieser Arbeit verwendete Plasmid pACN wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Mario Capecchi von der University of Utah zur Verfügung gestellt.

4.1.2. Ausarbeitung einer Southern Blot Strategie zum Nachweis der homologen Rekombination

Der Nachweis sowohl homologer, wie auch heterologer Rekombination des Targeting Konstrukts in das Genom der murinen ES Zellen erfolgte mittels Southern Blot Analyse. Dabei wird genomische DNA der ES Zellen mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten, die entstehenden DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese getrennt und anschließend auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Detektion der Fragmente erfolgt mittels einer radioaktiv markierten DNA Sonde. Zum eindeutigen Nachweis der homologen Rekombination muss die Sonde in einem Bereich binden, der entweder 5' strang-aufwärts oder 3' strangabwärts der Grenzen des Targeting Bereiches liegt. Da bei erfolgreicher Integration des Konstruktes zusätzliche Sequenzen in das Genom integriert werden und auch zusätzlich künstliche Restriktionsschnittstellen eingefügt werden, entstehen beim Restriktionsverdau von wildtyp und *knock-in* Allel Fragmente unterschiedlicher Größe, welche beide von derselben Sonde detektiert werden. Abbildung 4.2 zeigt die Details der Southern Strategie.

Abb. 4.2 Southern Strategie (s. nächste Seite). Die Targeting Region umfasst die Exons 3 bis 8 (blaue Boxen) und wird von den Restriktionsschnittstellen der Enzyme EcoRI und NsiI begrenzt. Der Targeting Vektor enthält im Intron 4 zusätzlich die von zwei loxP Seiten (grüne Dreiecke) flankierte ACN Kasette (rote Box) sowie 5' vor der ersten loxP Seite und 3' nach der zweiten loxP Seite zusätzliche Restriktionsschnittstellen für die Enzyme SspI und BamHI. Diese werden für die Southern Blot Analyse benötigt. Die Exons 4 und 7 (gelbe Boxen) enthalten die Punktmutationen Y527F, R669E und T670A. Das rekombinierte Allel entspricht dem Genom der embryonalen Stammzellen nach erfolgreicher homologer Rekombination. Chimäre Mäuse besitzen sowohl Zellen mit wildtyp Allel als auch mit dem rekombinierten Allel inklusive der ACN Kasette. Nach Verpaarung der chimären männlichen Mäuse mit weiblichen wildtyp Mäusen verbleibt in der F1 Generation nur noch eine loxP Seite sowie die zusätzlich eingefügten Restriktionsschnittstellen im Genom der Nachfahren. Die ACN Kasette ist nicht mehr im Genom der F1 Generation vorhanden. Die beim Restriktionsverdau der genomischen DNA entstehenden Fragmente sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Regionen in denen die 5', 3' und Neo Sonden binden sind jeweils eingezeichnet.

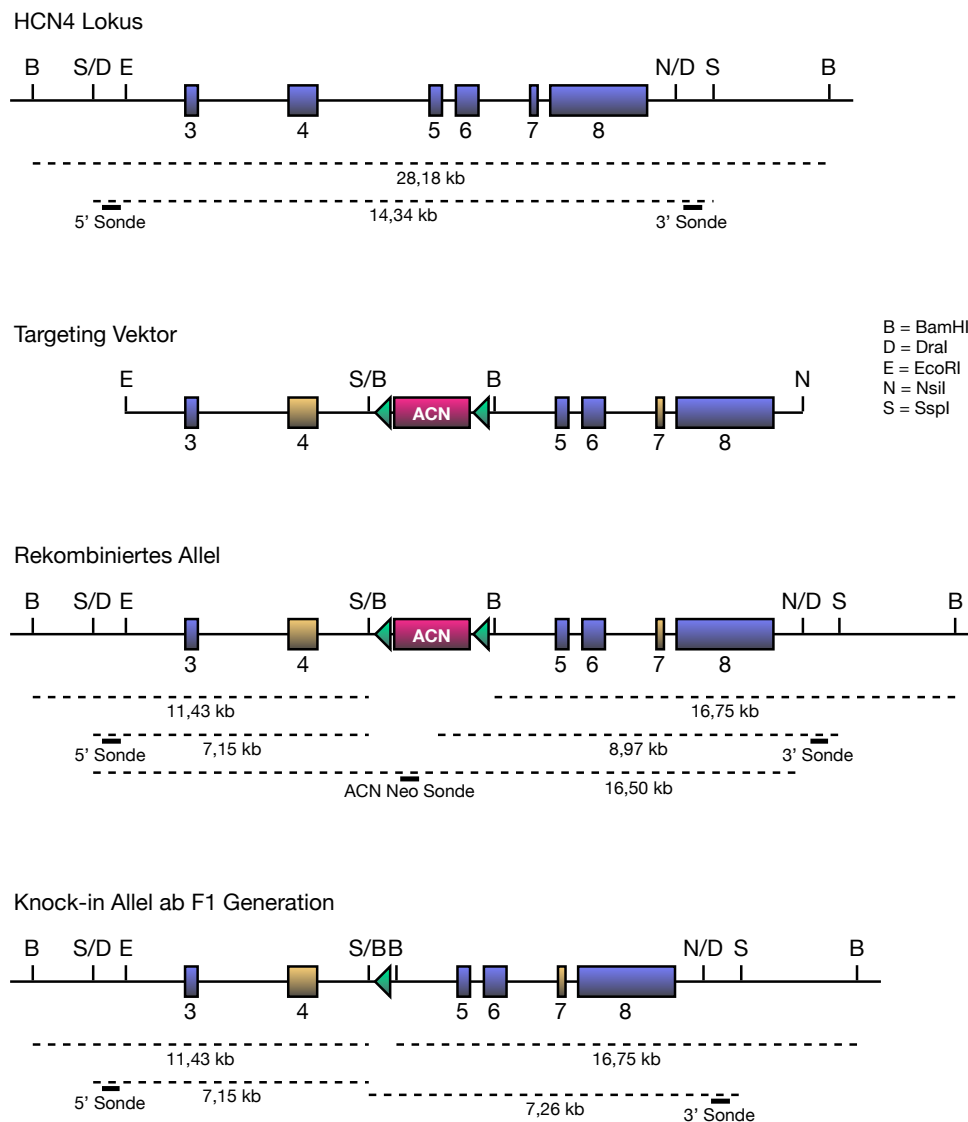


Abb. 4.2 Abbildungslegende siehe vorherige Seite.

4.1.3. Verifizierung der Southern Strategie mit genomischer DNA einer wildtyp Maus

Die verschiedenen Restriktionsenzyme, sowie DNA Sonden für die Southern Strategie wurden vor der endgültigen Festlegung des Designs des Targeting Vektors an genomischer DNA von wildtyp ES Zellen getestet (Abb. 4.3).

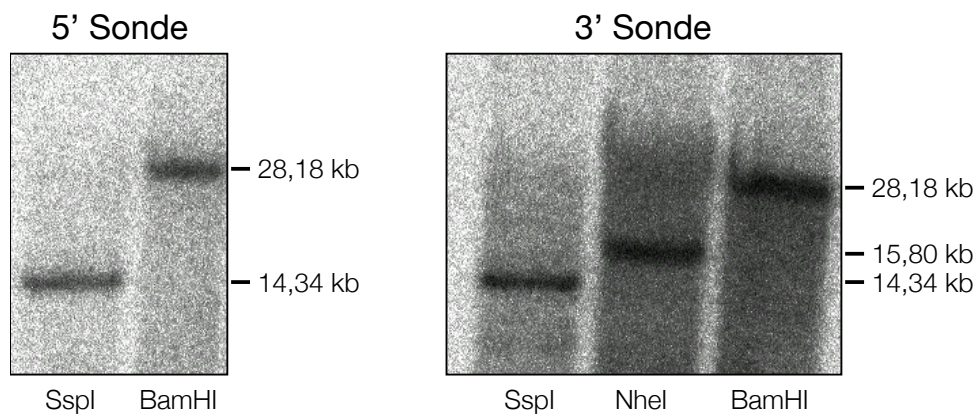


Abb. 4.3 Verifizierung der Southern Strategie mit der 5' Sonde (links) und der 3' Sonde (rechts). Neben den später für die Southern Blot Analyse verwendeten Restriktionsenzymen *SspI* und *BamHI* wurde hier auch noch das Enzym *NheI* getestet.

4.2. Klonierung des Targeting Vektors

Nachdem die Southern Blot Strategie verifiziert wurde, konnte mit der Ausarbeitung der Klonierungsstrategie für den Targeting Vektor begonnen werden. Im folgenden werden die einzelnen Klonierungsschritte beschrieben.

4.2.1. Herstellung von Hilfsvektoren

Da für einige Schritte der Klonierung des Targeting Vektors kein kommerziell erhältlicher Klonierungs-Vektor geeignet war, mussten zunächst zwei Hilfsvektoren mit den für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen hergestellt werden.

Der erste Hilfsvektor HVCG1 diente zur Aufnahme des murinen HCN4 Gens und somit als Rückgrat des fertigen Targeting Vektors. Als Ausgangspunkt diente der Vektor pBlueskript II SK (-) (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Aus diesem wurde mittels *BssHII* die komplette Polyklonierungsstelle herausgeschnitten und die Enden des verbleibenden Vektors dephosphoryliert. Zur Generierung einer maßgeschneiderten Polyklonierungsstelle wurden die benötigten Restriktionsschnittstellen geplant und zwei zueinander komplementäre synthetische Oligonukleotide (CGHV1for und CGHV1rev) bestellt (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland). Damit die synthetischen Oligonukleotide auch mit dem dephosphorylierten Vektor ligiert werden konnten, wurden sie vom Hersteller zusätzlich jeweils am 5' Ende mit einer Phosphatgruppe modifiziert.

Die synthetischen Oligonukleotide wurden zusammengelagert und anschließend mit dem zuvor vorbereiteten Vektor ligiert (Abb. 4.4). Der Vektor HVCG1 enthält bereits

die AscI Restriktionsschnittstelle, welche später für die Linearisierung des Targeting Vektors verwendet wird. Die Erkennungssequenz von AscI ist mit acht Basenpaaren Länge im Genom deutlich seltener vorhanden als kürzere Erkennungssequenzen anderer Restriktionsenzyme. AscI ist deshalb sehr gut für die Linearisierung von Targeting Vektoren geeignet.

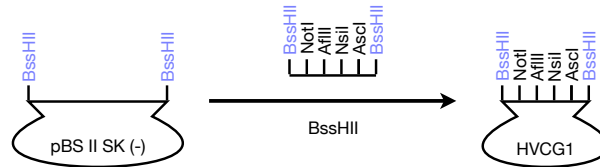


Abb. 4.4 Generierung des Hilfsvektors HVCG1. Die ursprüngliche Polyklonierungsstelle des Vektors pBlueskript II SK (-) wurde mit dem Enzym BssHII entfernt und der Vektor dephosphoryliert. Anschließend wurden die zusammengelagerten Oligonukleotide mit dem aufgeschnittenen Vektor ligiert. Der Vektor HVCG1 enthält bereits die AscI Restriktionsschnittstelle, welche später für die Linearisierung des Targeting Vektors verwendet wird.

Zur Generierung des zweiten Hilfsvektors HVACN2 für die ACN Kassette wurden ebenfalls zwei synthetische Oligonukleotide bestellt. Diese enthielten die für die Subklonierung, sowie die Southern Blot Analyse notwendigen Restriktionsschnittstellen. Als Ausgangsvektor diente auch hier der Vektor pBlueskript II SK (-) (Abb. 4.5).

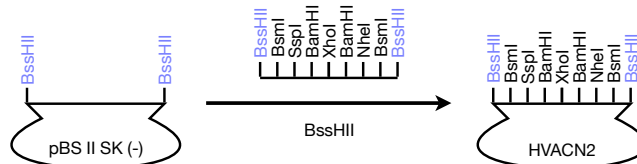


Abb. 4.5 Herstellung des Hilfsvektors HVACN2. Wie beim Hilfsvektor HVCG1 wurde auch hier die Polyklonierungsstelle des pBlueskript II SK (-) Vektors mit BssHII entfernt, der Vektor dephosphoryliert und anschließend mit den zusammengelagerten Oligonukleotiden ligiert.

4.2.2. Klonierung des Targeting Vektors

Ausgangspunkt für die Klonierung des Targeting Vektors war ein bereits bestehendes Plasmid, das den Bereich um die Exons 5 bis 8 des murinen HCN4 Gens im Vektor pGEM9 enthält. Darüber hinaus enthielt das Plasmid bereits die geplanten Mutationen (R669E und T670A) im Exon 7. Die Exons 3 und 4 inklusive der Introns 3 und 4 sollten zusätzlich in das bestehende Konstrukt integriert werden. Außerdem sollte in Exon 4 die Punktmutation Y527F eingebaut werden. Im letzten Schritt sollte schließlich die ACN Kassette zusammen mit den für die Southern Blot Analyse benötigten Restriktions-

schnittstellen in den Targeting Vektor integriert werden. Im folgenden wird die Klonierungsstrategie im Detail erläutert.

Der zu Beginn dieser Arbeit vorliegende Targeting Vektor umfasste die Exons 5 bis 8 und enthielt neben den gezielt eingefügten Mutationen im Exon 7 (R669E, T670A) noch die zu entfernende NeoTK Resistenzkassette (Abb. 4.5).

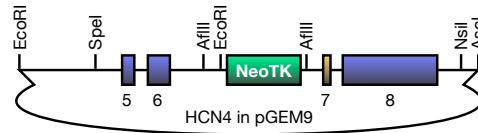


Abb. 4.5 HCN4 im Vektor pGEM9. Dieser Vektor diente als Ausgangspunkt für die Klonierung des neuen Targeting Vektors. Enthalten ist der genomische Bereich von EcoRI bis NsiI, der die Exons 5 bis 8 (blaue Boxen) umfasst. Exon 7 (gelbe Box) trägt die Punktmutationen (R669E und E670A). Zusätzlich enthält dieser Vektor eine Neomycin Resistenz sowie Thymidinkinase Kasette (NeoTK).

Zunächst wurde aus diesem Plasmid ein Fragment, welches unter anderem die Exons 5 und 6 umfasste, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und AflII ausgeschnitten und mit dem ebenfalls mit EcoRI und AflII geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pIND ligiert (Abb. 4.6). Da die Schnittstellen EcoRI und AflII in diesem Vektor in umgekehrter Reihenfolge enthalten sind, wurde das Fragment mit den Exons 5 und 6 in umgekehrter Orientierung in dieses Plasmid eingebaut.

Für die Konstruktion des Targeting Vektors wurde zusätzlich die genomische Sequenz jenseits von Exon 3 und 4 benötigt. Exon 4 war essentiell, da dort eine Punktmutation (Y527F) eingefügt werden sollte. Der Bereich um Exon 3 wurde als homologer Arm für die homologe Rekombination benötigt.

Zur Amplifikation des genomischen Bereiches von Exon 3 bis 4 wurden Polymerasekettenreaktionen mit genomischer DNA einer wildtyp Maus durchgeführt. Als erstes wurde das von den Restriktionsschnittstellen von EcoRI und NheI flankierte Exon 3 amplifiziert. Im zweiten Schritt dann das von NheI flankierte Exon 4. Für Exon 3 wurden die Primer HCN_sub_f_NEU und HCN4_sub_CG2r, für Exon 4 die Primer HCN_sub_CG1f und HCN4_sub_CG3r verwendet. Anschließend wurden beide PCR Produkte jeweils einzeln in den Vektor pIND integriert (Abb. 4.7).

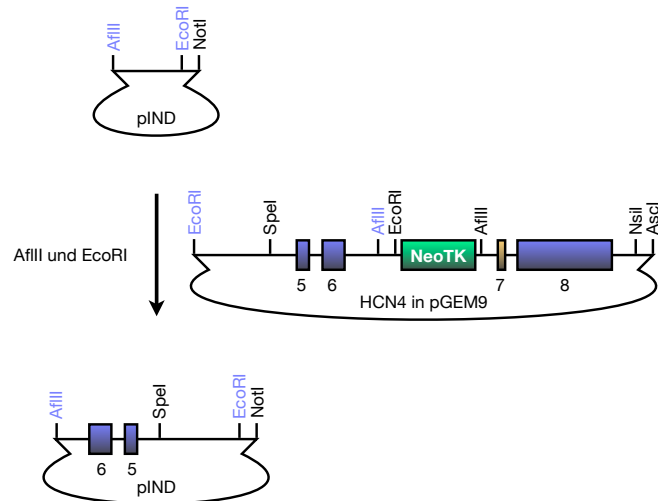


Abb. 4.6 Klonierung von Exon 5 und 6 in den Vektor pIND. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind farblich (blau) hervorgehoben. Im Vektor pIND sind die Exons aufgrund der Anordnung der Restriktionsschnittstellen AflIII und EcoRI in umgekehrter Orientierung integriert.

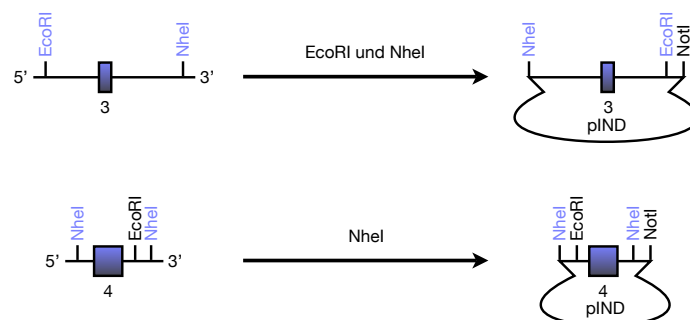


Abb. 4.7 Amplifikation der genomischen Abschnitte um Exon 3 (oben; blaue Box) und Exon 4 (unten; blaue Box) mittels PCR, sowie Subklonierung in den Vektor pIND. Nach der Amplifikation wurde das jeweilige PCR-Produkt mit den blau hervorgehobenen Restriktionsenzymen (EcoRI und NheI bei Exon 3; NheI bei Exon 4) geschnitten und mit dem ebenfalls geschnittenen sowie dephosphorylierten Vektor pIND ligiert. Wie in Abb. 4.6 werden auch hier die Exons aufgrund der Anordnung der Restriktionsschnittstellen in umgekehrter Orientierung im Vektor pIND integriert.

Mit dem Vektor pIND inklusive Exon 4 aus Abb. 4.7 wurde anschließend eine Polymerasekettenreaktion unter Zuhilfenahme des “QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit” (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde die Y527F Mutation in das Exon 4 eingefügt (Abb. 4.8). Die dabei verwendeten Primer waren HCN4_Y527F_f und HCN4_Y527F_r.

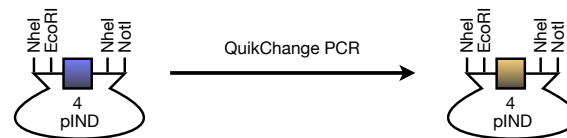


Abb. 4.8 QuikChange PCR mit wildtyp Exon 4 (blaue Box) im Vektor pIND. Das nach der PCR mutierte Exon 4 ist als gelbe Box dargestellt.

Das von EcoRI und NheI flankierte Exon 3 im Vektor pIND aus Abb. 4.7 (oben) wurde mit dem Restriktionsenzym NheI aufgeschnitten, die Enden des Vektors dephosphoryliert und anschließend das von NheI flankierte Exon 4 inklusive der Punktmutation (aus Abb. 4.8) eingefügt.

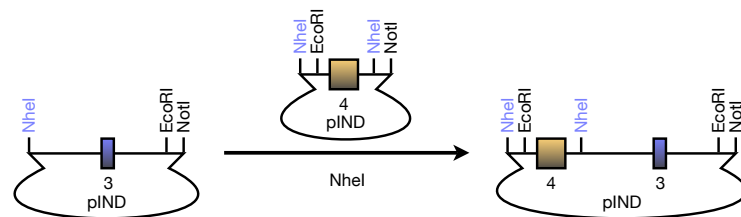


Abb. 4.9 Einfügen des mutierten Exons 4 in den Vektor Exon3 pIND (aus Abb. 4.7 oben). pIND inklusive Exon 3 (blaue Box) wurde mit NheI linearisiert und das von NheI flankierte, mutierte Exon 4 (gelbe Box) eingefügt.

Anschließend wurde die komplette von EcoRI flankierte Sequenz der Exons 3 bis 4 aus dem Vektor pIND (aus Abb. 4.9 rechts) herausgeschnitten und mit dem Vektor pIND der bereits die Exons 5 und 6 (flankiert von AflII und EcoRI) (aus Abb. 4.6) enthielt, ligiert (Abb. 4.10).

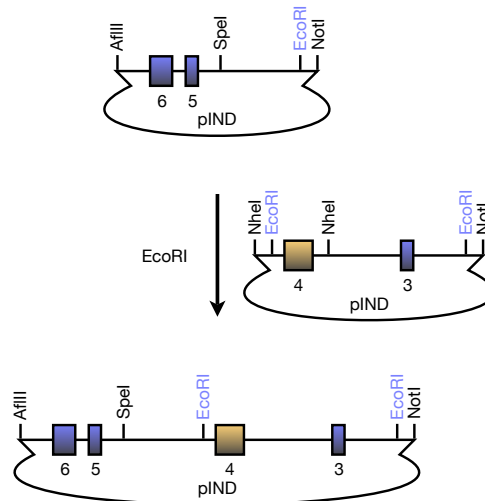


Abb. 4.10 Einfügen der von *EcoRI* flankierten Exons 3 und 4 in den Vektor *pIND* aus Abb. 4.6.

Zur Klonierung des letztendlichen Targeting Vektors wurde der Hilfsvektor HVCG1 mit den Restriktionsenzymen *AflIII* und *NsiI* aufgeschnitten, dephosphoryliert und mit dem von *AflIII* und *NsiI* flankierten Fragment, das die Exons 7 und 8 umfasste, ligiert (Abb. 4.11). Der entstehende Targeting Vektor dient im Folgenden zur Aufnahme der weiteren zuvor zusammengesetzten Genabschnitte.

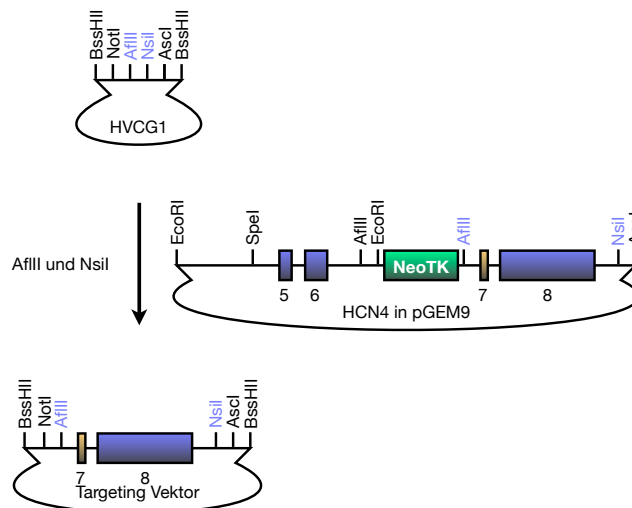


Abb. 4.11 Umklonierung der von *AflIII* und *NsiI* begrenzten Genregion um die Exons 7 und 8 aus dem Vektor *pGEM9* in den Hilfsvektor *HVCG1*.

Anschließend wurde der erhaltene Vektor aus Abb. 4.11 mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *AflIII* aufgeschnitten, dephosphoryliert und mit dem von *NotI* und *AflIII* flankierten Fragment, welches die Exons 3 bis 6 umfasste, ligiert (Abb. 4.12).

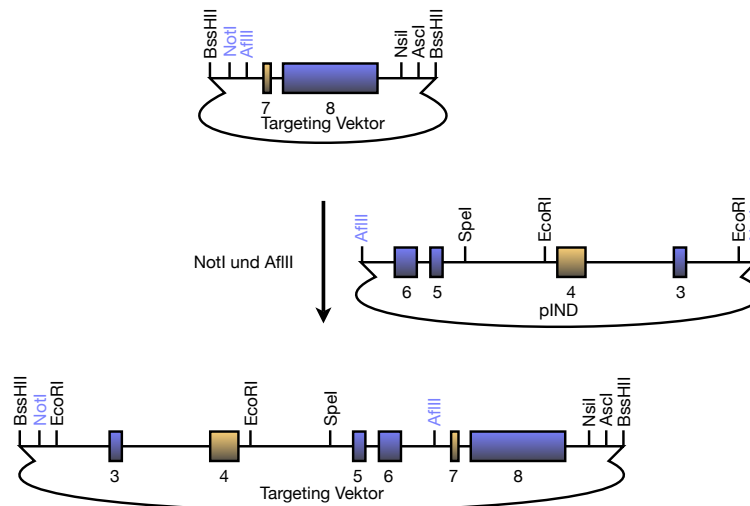


Abb. 4.12 Klonierungsschema zum Einfügen der Exons 3 bis 6 in den Targeting Vektor aus Abb. 4.11. Das die Exons 3 bis 6 umfassende Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen NotI und AflII aus dem Vektor pIND in den Targeting Vektor umklont.

Im Intron 4 des murinen HCN4 Gens wurde eine artifizielle BsmI Restriktionsschnittstelle an der Position der natürlichen SpeI Schnittstelle benötigt, um dort später die ACN Kasette einfügen zu können. Das direkte Einfügen der ACN Kasette über SpeI war nicht möglich, da in der Sequenz der ACN Kasette ebenfalls eine SpeI Schnittstelle vorkommt. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein Adapter in den Targeting Vektor eingebaut. Dazu wurde ein kleines synthetisches Oligonukleotid (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) geordert, das die Erkennungssequenz für das Enzym BsmI, flankiert von je einer SpeI Schnittstelle, enthielt. Der Targeting Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym SpeI linearisiert, dephosphoryliert und anschließend mit dem doppelsträngigen Oligonukleotid ligiert (Abb. 4.13).

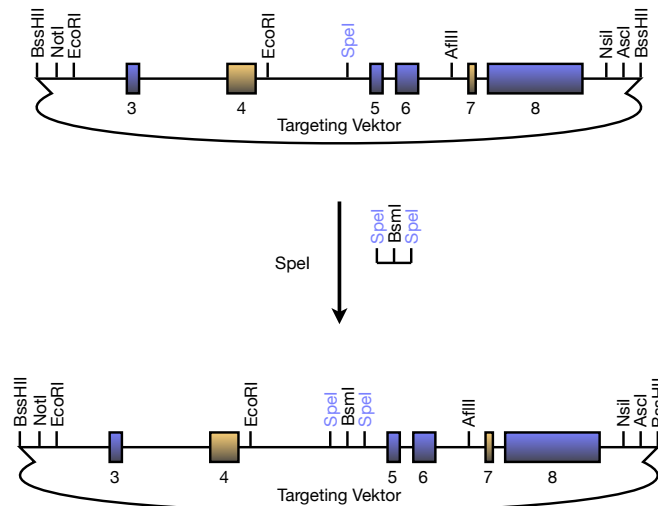


Abb. 4.13 Einfügen des *BsmI* Adapters in den Targeting Vektor. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *SpeI* (blau hervorgehoben) geschnitten und anschließend mit dem doppelsträngigen Oligonukleotid ligiert.

Für die Subklonierung der ACN Kasette in den Hilfsvektor HVACN2 wurde das Plasmid pACN sowie der Hilfsvektor HVACN2 mit *XhoI* geschnitten und die von *XhoI* flankierte ACN Kasette mit dem dephosphorylierten Hilfsvektor ligiert (Abb. 4.14). Die Subklonierung war deshalb notwendig, da die für die Southern Blot Analyse, sowie den Einbau in den Targeting Vektor notwendigen Restriktionsschnittstellen im ursprünglichen Vektor pACN nicht vorhanden waren.

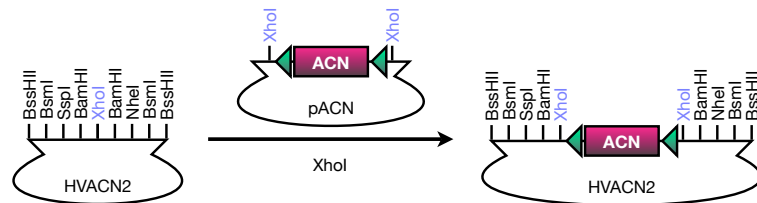


Abb. 4.14 Subklonierung der ACN Kasette aus dem Vektor pACN in den Hilfsvektor HVACN2. Der Hilfsvektor HVACN2 wurde mit dem Restriktionsenzym *XhoI* aufgeschnitten, die Enden dephosphoryliert und anschließend mit der von *XhoI* flankierten ACN Kasette ligiert.

Im letzten Schritt wurde sowohl der Targeting Vektor als auch die ACN Kasette im Hilfsvektor HVACN2 mit dem Enzym *BsmI* geschnitten und anschließend die von *BsmI* Restriktionsschnittstellen flankierte ACN Kasette mit dem geöffneten Targeting Vektor ligiert (Abb. 4.15). Nach Transformation in kompetente *E. coli* und Identifizierung eines richtigen Klon wurde eine Plasmidpräparation (Midiprep) durchgeführt.

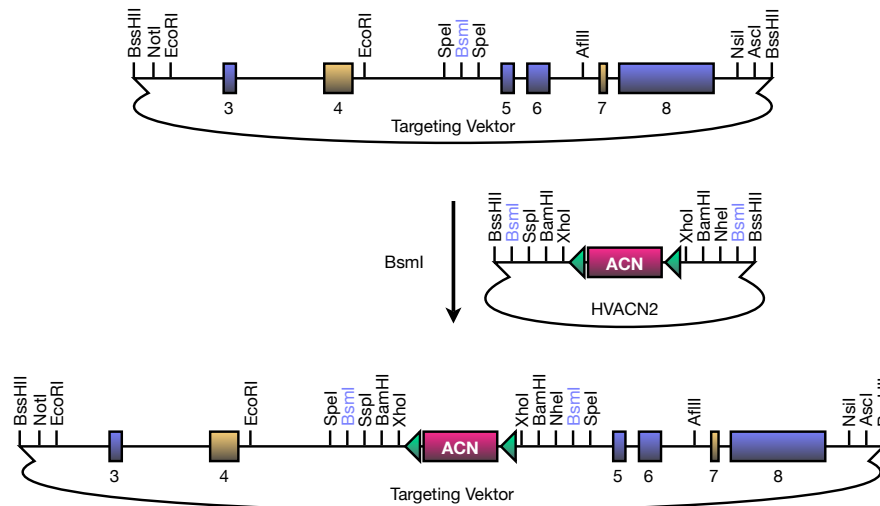


Abb. 4.15 Fertigstellung des Targeting Vektors. Der Targeting Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *BsmI* (blau hervorgehoben) linearisiert, die Enden dephosphoryliert und anschließend mit der von *BsmI* flankierten ACN Kasette ligiert. Die *AscI* Schnittstelle am 3' Ende dient später zur Linearisierung des Targeting Vektors.

4.2.3. Überprüfung des fertigen Targeting Vektors mittels Restriktionsverdau

Im Anschluss an die Plasmidaufreinigung wurde zur Überprüfung der Identität und Reinheit der DNA ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRV* und *ScaI* durchgeführt und die entstehenden Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 4.16).

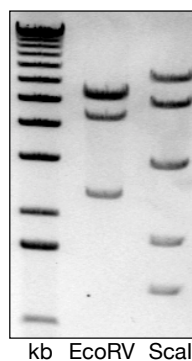


Abb. 4.16 Restriktionsanalyse des fertig gestellten Targeting Vektors. Entstehende Fragmente (Größe der DNA-Fragmente in [bp]): *EcoRV* (2409, 4451, 5318, 5334), *ScaI* (1292, 1767, 3021, 5054, 6378)

4.2.4. Sequenzierung des fertigen Targeting Vektors

Nach der Fertigstellung des Targeting Vektors wurde der komplette Abschnitt des Targeting Bereichs zwischen den Restriktionsschnittstellen für EcoRI und NsiI sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte, dass sowohl die Resistenzkassette inklusive der loxP Seiten, als auch die eingefügten Mutationen korrekt vorhanden waren. Die vollständige Sequenz des Targeting Vektors, sowie die verwendeten Primer befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

4.2.5. Aufreinigung des Targeting Vektors

Da für die Durchführung des Targetings DNA von sehr hoher Reinheit und in relativ großer Menge benötigt wurde, wurde der Targeting Vektor mittels des “Large Construct Kit” (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Dabei wurde ein 500 ml Ansatz Bakterien lysiert und anschließend das gewünschte Plasmid isoliert. Zusätzlich wurden eventuell vorhandene Verunreinigungen mit bakterieller genomischer DNA mittels einer ATP-abhängigen Exonuklease verdaut. Das am Ende der Aufreinigung erhaltene DNA Pellet wurde in 100 μ l TE Puffer gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt ($c = 6,9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Um die Identität und Reinheit des aufgereinigten Plasmids zu überprüfen, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt und die entstehenden Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 4.17).

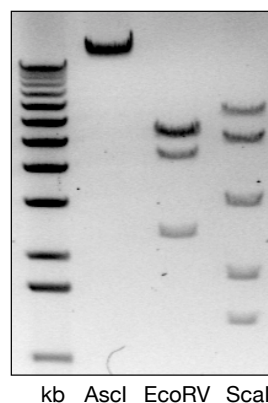


Abb. 4.17 Restriktionsanalyse des aufgereinigten Targeting Vektors. Entstehende Fragmente (Größe der DNA-Fragmente in [bp]): *AscI* (17489, linearisierter Targeting Vektor), *EcoRV* (2409, 4451, 5318, 5334), *ScaI* (1292, 1767, 3021, 5054, 6378)

4.2.6. Linearisierung und Fällung des Targeting Vektors für die Elektroporation in embryonale Stammzellen

Für die Elektroporation wurden 100 µg des Targeting Vektors mit dem Enzym AscI für vier Stunden bei 37 °C linearisiert. Anschließend wurde eine Phenol Chloroform Extraktion durchgeführt. Um sicherzustellen, dass die DNA komplett linearisiert vorlag, wurde mit je einem Mikroliter des linearisierten und unlinearisierten Targeting Vektors eine Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 4.18).

Die linearisierte DNA des Targeting Vektors wurde durch Zugabe von Natriumacetat und absolutem Ethanol gefällt und die DNA Flocke mit einer sterilen Pipettenspitze in 70 % (Vol/Vol) Ethanol überführt und bei -20 °C gelagert.

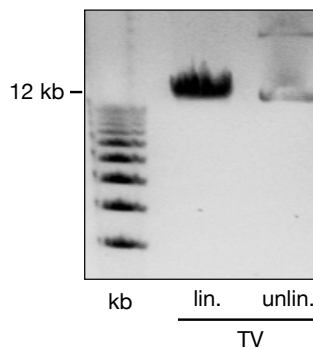


Abb. 4.18 Gelelektrophorese des Targetingvektors nach Linearisierung mit dem Restriktionsenzym Asc I (TV, lin.) und unlinearisiert (TV, unlin.).

4.3. Gtargeting

Sämtliche Arbeiten der embryonalen Stammzellkultur wurden in den Labors von Prof. Dr. Reinhard Fässler unter Leitung von Dr. Markus Moser am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) nach einem etablierten Protokoll durchgeführt (Talts, Brakebusch et al. 1999).

4.3.1. Elektroporation

Nach der Linearisierung wurden ca. 60 µg des Targeting Vektors in 4×10^7 embryonale Stammzellen vom Stamm 129/Sv elektroporiert und diese anschließend auf Feeder Zellen in Petri-Schalen in ES-Zell Medium ausgesät.

4.3.2. Selektion der embryonalen Stammzellen mit G418

Nach 24 Stunden wurde mit der positiv-Selektion der embryonalen Stammzellen begonnen. Dazu wurde das normale ES-Zell Medium durch ES-Zell Medium dem das Aminoglykosid Antibiotikum Geneticin (G418) zugesetzt wurde, ausgetauscht. Zellen,

die das Targeting Konstrukt in ihr Genom integriert haben, sind resistent gegenüber Geneticin, während alle anderen Zellen abgetötet werden. Bis die einzelnen Stammzell-Kolonien eine ausreichende Größe erreicht hatten, wurde das ES-Zell Medium (+G418) täglich gewechselt. Nach ca. einer Woche konnte mit dem Picken der einzelnen Klone begonnen werden.

4.3.3. Picken der embryonalen Stammzellen

Es wurden in beiden durchgeführten Targetings jeweils 360 Stammzellklone unter dem Stereomikroskop gepickt und diese anschließend in 24-Well Platten ausgesät. Bis zum Erreichen einer ausreichenden Zelldichte wurden die Stammzellen einige Tage kultiviert, bevor mit dem Einfrieren begonnen werden konnte.

4.3.4. Einfrieren der Stammzellen

Drei bis fünf Tage nach der Isolation der Stammzellklone wurde ein Aliquot jedes Klons für die spätere Blastozysten-Injektion weggefroren. Der verbleibende Teil der Stammzellen wurde so lange weiter kultiviert, bis die Nährstoffe des Mediums aufgebraucht waren.

4.3.5. Isolation genomischer DNA

Die Stammzellen wurden in den 24-Well Platten mit Proteinase K lysiert und anschließend die genomische DNA mit Hilfe von Isopropanol gefällt. Die jeweils entstehende DNA Flocke wurde in TE Puffer überführt und die DNA anschließend gelöst. Die isolierte genomische DNA diente im Anschluss für die Southern Blot Analyse.

4.4. Analyse der veränderten embryonalen Stammzellen

Zur Identifizierung derjenigen Stammzellklone, bei denen das Targeting Konstrukt vollständig und durch homologe Rekombination in das Genom integriert wurde, wurde eine Southern Blot Analyse, gefolgt von einer DNA-Sequenzierung kritischer Bereiche durchgeführt.

4.4.1. Southern Blot Analyse

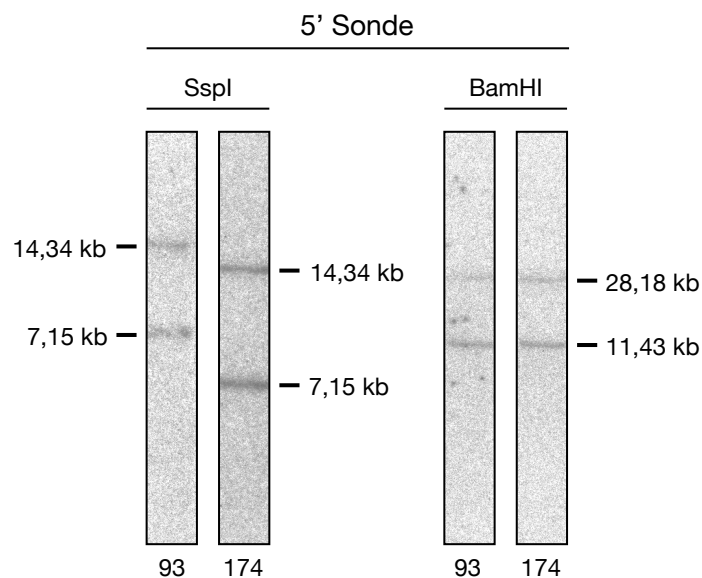
Zunächst wurde je ein Teil der genomischen DNA der 360 ES Zell-Klone mit dem Restriktionsenzym SspI geschnitten und die entstehenden Fragmente mit der 5' Sonde hybridisiert. Die Größe der detektierten Fragmente ist Tabelle 4.1 zu entnehmen. Bei diesem ersten Schritt wurden 19 Klone mit korrekter 5' Integration identifiziert. Der Rest der Klone zeigte nur die wildtyp-Bande und konnte so für die weitere Analyse ausgeschlossen werden.

Die als richtig identifizierten Klone wurden anschließend genauer untersucht. Dazu wurde die genomische DNA mit weiteren Restriktionsenzymen (Tabelle 4.1) geschnitten und mit der jeweiligen Sonde hybridisiert.

Tabelle 4.1 Übersicht der für die Southern Blot Analyse verwendeten Restriktionsenzyme mit Angabe der Größe der von der jeweiligen Sonde detektierten Fragmente (Größe der Fragmente in [kb], WT = wildtyp, KI = knock-in).

Restriktionsenzym	5' Sonde		3' Sonde	
	WT	KI	WT	KI
<i>SspI</i>	14,34	7,15	14,34	8,97
<i>BamHI</i>	28,18	11,43	28,18	16,75

Nach der Hybridisierung der *SspI*- und *BamHI*- Fragmente mit der 5' Sonde, sowie der 3' Sonde wurden 16 der zuvor 19 Stammzellklone identifiziert, bei denen jeweils die wildtyp- und die *knock-in* Bande vorhanden war.



*Abb. 4.19 Ergebnis der Southern Blots nach Hybridisierung mit der 5' Sonde. Die Klone #93 und #174 befanden sich beim *SspI* Blot auf unterschiedlichen Membranen, wodurch der Unterschied der Wanderungsweite der detektierten Banden resultiert. Dargestellt sind nur die beiden Klone, die später für die Injektion in die Blastozysten verwendet wurden.*

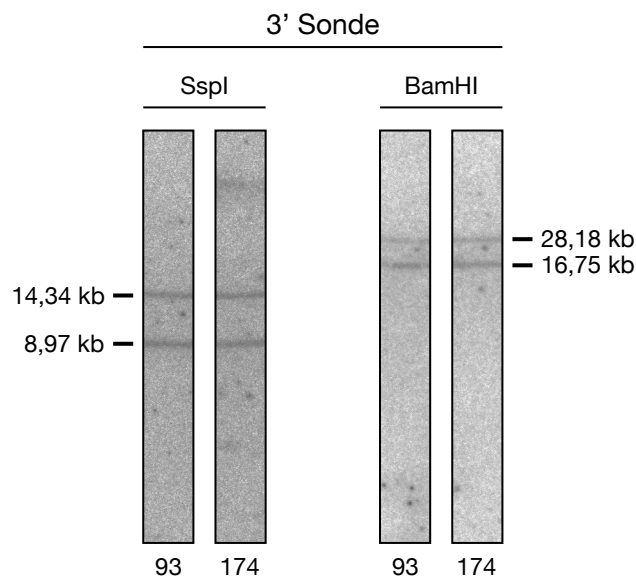


Abb. 4.20 Ergebnis der Southern Blots nach Hybridisierung mit der 3' Sonde. Dargestellt sind nur Klon #93 und #174.

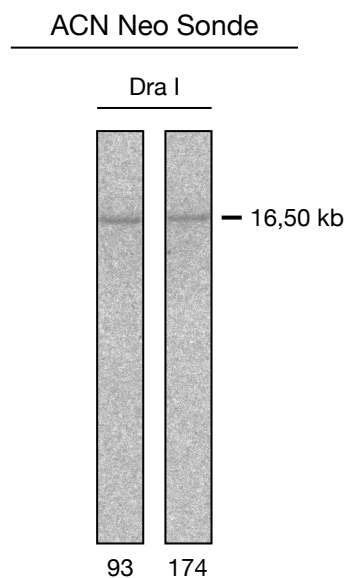


Abb. 4.21 Ergebnis der Southern Blots der Klone #93 und #174 nach Hybridisierung mit der ACN Neo Sonde.

Um auszuschließen, dass die ACN Kasette mehrfach bzw. heterolog an anderer Stelle in das Genom integriert hatte, wurde die genomische DNA der verbleibenden 19 Stammzellklone mit dem Enzym DraI geschnitten und mit einer dem Bereich der Neomycin Phosphotransferase komplementären Sonde (ACN Neo Sonde) hybridisiert. Bei homologer Rekombination wird dabei eine Bande der Größe 16,50 kb detektiert (Abb. 4.21). Zusätzliche Banden anderer Größe im Southern Blot würden auf eine mehrfach-

Integration schließen lassen. Dies war bei drei Klonen der Fall. Mittels Southern Blot Analyse wurden somit insgesamt 16 der 360 Stammzellklone identifiziert, bei denen das Targeting Konstrukt homolog in das Genom rekombinierte. Im Folgenden wurden diese 16 Klone genauer untersucht.

4.4.2. Sequenzierung der genomischen DNA der embryonalen Stammzellen

Mittels Southern Blot lässt sich nur die Integration und somit die homologe Rekombination der artifiziellen Schnittstellen nachweisen, nicht aber, ob auch das komplette Targeting Konstrukt inklusive der Mutationen in das Genom integriert wurde. Für diesen Nachweis wurden Teile von Exon 4 und Exon 7 mittels PCR amplifiziert und die entstandenen PCR Produkte aufgereinigt und sequenziert. Tabelle 4.2 zeigt die Primer-Kombinationen, die für die Amplifikation, sowie für die anschließende Sequenzierung verwendet wurden.

Tabelle 4.2 Für die Sequenzierung der embryonale Stammzellen verwendete Primer-Kombinationen.

	<i>Exon 4</i>	<i>Exon 7</i>
<i>forward Primer:</i>	<i>ES_cell_Ex4_fn</i>	<i>HCN4_Ex7*8_2f</i>
<i>reverse Primer:</i>	<i>ES_cell_Ex4_fr</i>	<i>ES_cell_Ex7_mut_rev</i>

Die Sequenzierungen ergaben, dass nur bei einem kleinen Teil der Stammzellklone sowohl die Mutation im Exon 4 als auch die Mutationen im Exon 7 vorhanden waren. Es wurden nur 2 Klone identifiziert, die das komplette Targeting-Konstrukt inklusive aller Mutationen integriert hatten. Bei jeweils 3 Stammzell-Klonen waren entweder nur die Mutation im Exon 4 oder die Mutationen im Exon 7 vorhanden, während bei den restlichen acht der 16 Stammzellklone gar keine der Mutationen in das Genom integriert wurden. Dies zeigt, dass beim Austausch der Geninformation mittels homologer Rekombination nicht immer das komplette Targeting Konstrukt, sondern in den meisten Fällen nur die Resistenzkassette mit einem Teil der homologen Bereiche des Targeting Vektors integriert wurde.

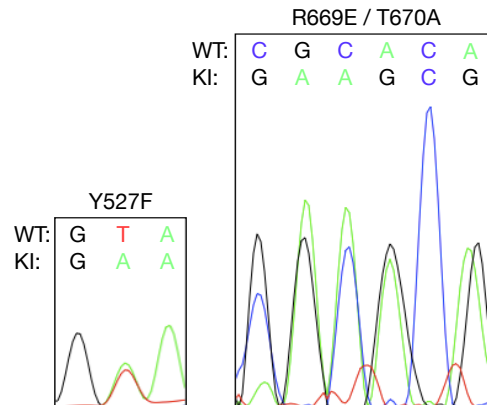


Abb. 4.22 Sequenzierung des ES Zell Klons #93. Das PCR Produkt von Exon 4 (Y527F Mutation) wurde bei diesem Klon mit dem reverse Primer sequenziert, deshalb entsprechen die hier abgebildeten Basen der revers komplementären Sequenz. Das PCR Produkt von Exon 7 (R669E/T670A Mutationen) wurde mit dem forward Primer sequenziert. Es ist sowohl im Exon 4 als auch im Exon 7 das wildtyp (WT) und das knock-in (KI) Signal zu sehen.

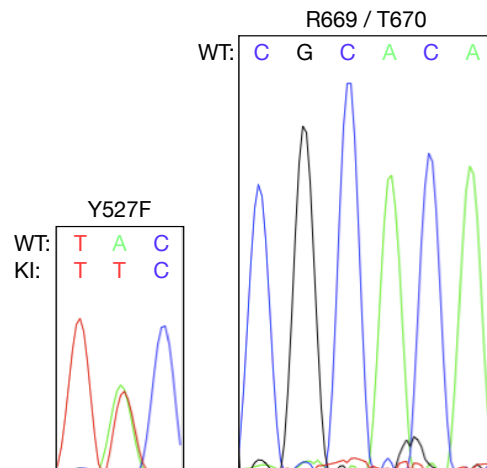


Abb. 4.23 Sequenzierung des ES Zell Klons #174. Dieser ES Zell Klon trägt nur die Mutation im Exon 4 (Y527F), nicht aber die Mutationen im Exon 7.

Über die Sequenzierung der mutierten Bereiche in Exon 4 und 7 hinaus wurde der 5' und 3' Homologiebereich an den Grenzen des Targeting Bereichs mittels PCR amplifiziert und die entstandenen PCR Produkte sequenziert, um auszuschließen, dass zusätzlich zum Targeting Konstrukt auch noch Abschnitte des pBlueskript II SK (-) Vektors in das Genom integriert wurden. Die Sequenzanalyse bestätigte, dass keine zusätzlichen unerwünschten Sequenzen in das Genom aufgenommen wurden. Tabelle 4.3 stellt die Ergebnisse der Sequenzierungen der Stammzellen mit mindestens einer Mutation dar.

Tabelle 4.3 Ergebnisse der Sequenzanalyse der embryonalen Stammzellen
 (“✓” = Mutation vorhanden bzw. Bereich korrekt; “-” = Mutation nicht
 vorhanden; “n.ü.” = nicht überprüft).

<i>Stamm- zellklon</i>	<i>Y527F</i>	<i>R669E, T670A</i>	<i>5' Homolo- gie-Bereich</i>	<i>3' Homolo- gie-Bereich</i>
93	✓	✓	✓	✓
167	-	✓	n.ü.	n.ü.
169	-	✓	n.ü.	n.ü.
174	✓	-	✓	✓
191	✓	-	✓	✓
270	✓	✓	✓	✓
310	✓	-	✓	✓
351	-	✓	n.ü.	n.ü.

Für die Injektion und Generierung der chimären Mäuse wurde je ein Klon der Linie HCN4^{Y527F} (Klon #174) und der Linie HCN4^{FEA} (Klon #93) ausgewählt. Klone, die nur die Mutationen im Exon 7 aufwiesen wurden nicht injiziert, da bereits bekannt ist, dass eine alleinige Mutation der CNBD bereits während der Embryonalentwicklung letal ist (Harzheim, Pfeiffer et al. 2008).

4.5. Injektion der embryonalen Stammzellen

Nach der Identifizierung der für die Generierung der chimären Mäuse zu verwendenden Stammzellklone #93 und #174 wurden diese aufgetaut und erneut in Kultur genommen. Sowohl die Injektion der embryonalen Stammzellen, als auch die Generierung der chimären Mäuse erfolgte in der “Transgenic Core Facility” des Max-Planck-Instituts für Biochemie (Martinsried) unter der Leitung von Dr. Michael Bösl. Dort wurden die veränderten embryonalen Stammzellen, die vom Stamm 129/Sv stammten in Embryonen vom Stamm C57BL/6N im acht-Zellen Stadium injiziert. Die Embryonen wurden anschließend in den Uterus scheinschwangerer Mäuse implantiert, welche die chimären Mäuse zur Welt brachten.

4.6. Verpaarung der Chimären

Die vom Max-Planck-Institut für Biochemie erhaltenen Chimären wurden im ersten Schritt mit wildtyp Mäusen des Stammes C57BL/6N verpaart. Dabei kann schon anhand der Fellfarbe der F1 Generation eine Aussage über die Keimbahngängigkeit der Mutationen erfolgen. Die braune (agouti) Fellfarbe des 129/Sv Stammes wird dominant gegenüber der schwarzen Fellfarbe des C57BL/6N Stammes vererbt. Tragen also die Nachfahren der Chimären Mäuse braunes Fell, so tragen sie mit 50 % Wahrscheinlichkeit auch die eingefügten Mutationen im Genom (Talts, Brakebusch et al. 1999).

Der Anteil an somatischen Zellen in den erwachsenen Chimären, die aus veränderten embryonalen Stammzellen hervorgegangen sind, lässt sich am Anteil der braunen Fellfarbe abschätzen. Die Chimären von Klon #174 hatten einen braunen Fellanteil von ca. 60 % - 95 %, die zwei Chimären von Klon #93 jeweils nur von ca. 40 %.

Die Zuchten der Linie HCN4^{Y527F} (Klon #174) brachten Nachfahren mit brauner Fellfarbe zur Welt, wodurch die Keimbahngängigkeit der veränderten embryonalen Stammzellen nachgewiesen war. Die genaue Analyse der Mauslinie wird im Kapitel 4.9 beschrieben.

Sämtliche Zuchten der Linie HCN4^{FEA} (Klon #93) produzierten nur Nachfahren mit schwarzer Fellfarbe, was bedeutet, dass die eingefügten Mutationen nicht keimbahngängig waren. Auch die erneute Generierung von chimären Mäusen aus embryonalen Stammzellen von Klon #270, der ebenfalls alle drei Mutationen integriert hatte, brachte keinen Erfolg. Deshalb war es notwendig das gesamte Gentergeting zu wiederholen. Dies wird im folgenden Kapitel beschrieben.

4.7. Erneutes Gentergeting zur Generierung der HCN4^{FEA} Mauslinie

Es wurden wiederum 360 Stammzellklone gepickt. Nach der Isolierung der genomischen DNA aus den veränderten embryonalen Stammzellen wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt (Abb. 4.24, Abb. 4.25 und Abb. 4.26). Dabei wurden insgesamt 24 Klone mit korrekter 5' Integration identifiziert, die daraufhin mit den weiteren Restriktionsenzymen und Sonden analysiert wurden. Abgebildet sind jeweils nur die Blots der Klone, die später für die Blastozysten-Injektion verwendet wurden.

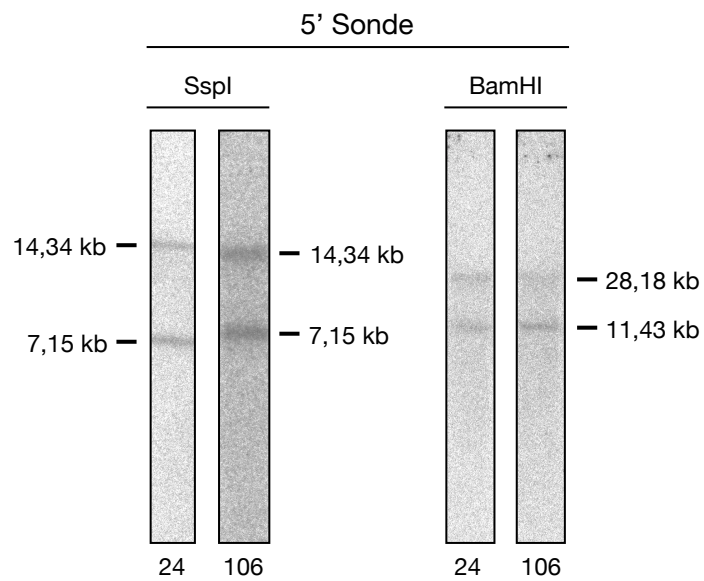


Abb. 4.24 Southern Blot der Klone #24 und #106, hybridisiert mit der 5' Sonde.

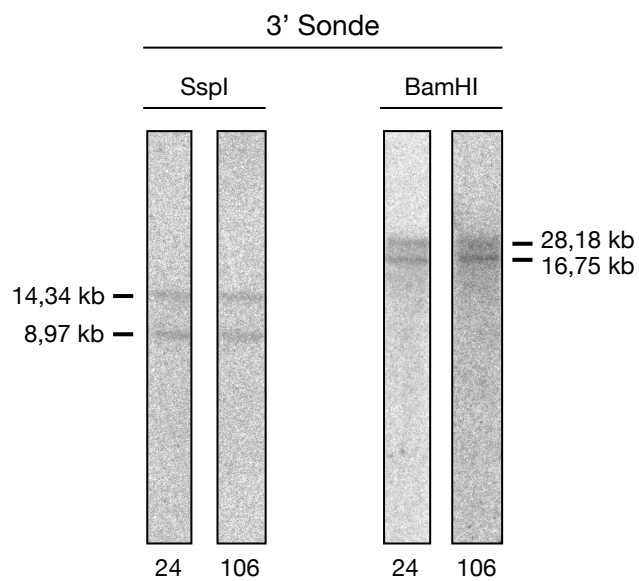


Abb. 4.25 Southern Blot der Klone #24 und #106, hybridisiert mit der 3' Sonde.

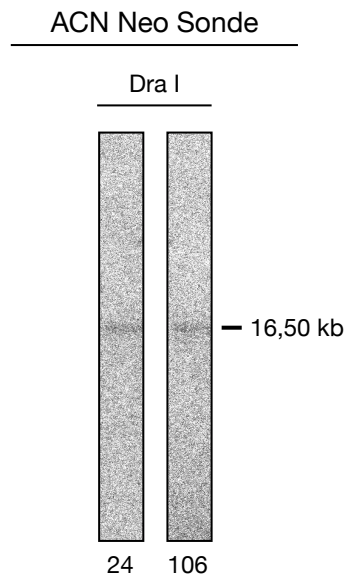


Abb. 4.26 Southern Blot der Klone #24 und #106, hybridisiert mit der ACN Neo Sonde.

Zur Überprüfung der 24 ES Zell Klone auf die Mutationen wurden wiederum die entsprechenden genomischen Abschnitte mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Darüber hinaus wurde auch hier von den beiden richtigen Stammzellklonen die 5' und 3' Grenzen der Targeting Region sequenziert, um auszuschließen, dass zusätzliche Sequenzen integriert wurden. Tabelle 4.4 stellt die Ergebnisse der Sequenzierungen der Stammzellen mit mindestens einer Mutation dar.

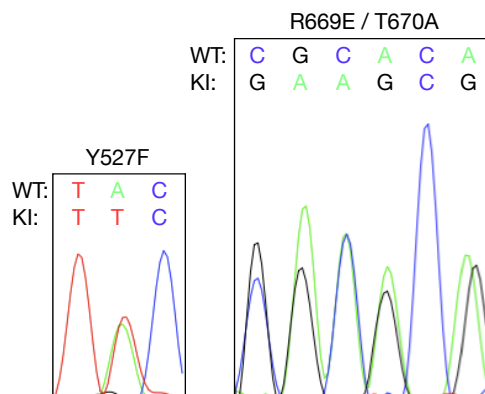


Abb. 4.27 Ergebnis der Sequenzierung von ES Zell Klon #106.

Tabelle 4.4 Ergebnisse der Sequenzanalyse der embryonalen Stammzellen (“✓” = Mutation vorhanden bzw. Bereich korrekt; “-” = Mutation nicht vorhanden; “n.ü.” = nicht überprüft).

<i>Stamm- zellklon</i>	<i>Y527F</i>	<i>R669E, T670A</i>	<i>5’ Homolo- gie-Bereich</i>	<i>3’ Homolo- gie-Bereich</i>
24	✓	✓	✓	✓
54	✓	-	n.ü.	n.ü.
86	✓	-	n.ü.	n.ü.
106	✓	✓	✓	✓
120	✓	-	n.ü.	n.ü.
134	✓	-	n.ü.	n.ü.
150	✓	-	n.ü.	n.ü.
168	✓	-	n.ü.	n.ü.
179	✓	-	n.ü.	n.ü.
209	✓	-	n.ü.	n.ü.
311	✓	-	n.ü.	n.ü.
333	✓	-	n.ü.	n.ü.
334	-	✓	n.ü.	n.ü.
354	✓	-	n.ü.	n.ü.

Wie im ersten Gentergeting wurden auch hier zwei Klone (#24 und #106) identifiziert, die das komplette Targeting Konstrukt integriert hatten. Beide embryonalen Stammzellklone wurden wiederum in Kultur genommen, injiziert und die chimären Mäuse in der “Transgenic Core Facility” des Max-Planck-Instituts für Biochemie (Martinsried) generiert.

Von Klon #24 wurden nur zwei Chimären mit je ca. 50 % braunem Fellanteil erhalten (1 Weibchen und 1 Männchen), die miteinander verpaart wurden. Sie brachten aber bis zum Druck dieser Arbeit nur Nachkommen mit schwarzer Fellfarbe zur Welt. Die veränderten Stammzellen waren also nicht keimbahngängig.

Der braune Fellanteil der Chimären von Klon #106 (9 Männchen und 8 Weibchen) lag zwischen 70 % und 100 %. Zwei der angesetzten Zuchten produzierten Nachfahren mit brauner Fellfarbe, wodurch dieses mal die Keimbahngängigkeit der veränderten embry-

onalen Stammzellen bestätigt werden konnte. Die genaue Analyse der Mauslinie wird in Kapitel 4.9 beschrieben.

4.8. Effizienz des Gtargetings

In beiden durchgeführten Gtargetings wurden jeweils zwei aus 360 Stammzellklonen identifiziert, bei denen das Targeting Konstrukt inklusive aller Mutationen erfolgreich durch homologe Rekombination in das Genom integriert wurde. Die Wahrscheinlichkeit für dieses Targeting Konstrukt, komplett in das Genom integriert zu werden lag in beiden durchgeführten Gtargetings bei 0,56 %.

4.9. Analyse der generierten Mauslinien

4.9.1. Genotypisierungsstrategie

Zur Genotypisierung der beiden Mauslinien wurde eine PCR Strategie entwickelt. Die Genotypisierungs-Primer binden 5' bzw. 3' der nach der Exzision der ACN Kasette im Genom verbleibenden loxP Seite, wodurch vom wildtyp und *knock-in* Allel unterschiedlich große PCR Produkte (wildtyp 345 bp; *knock-in* 471 bp) entstehen. Diese können anschließend mittels klassischer Gelelektrophorese identifiziert werden (Abb. 4.28). Da sich die beiden Mauslinien nur in den Punktmutationen unterscheiden, kann für beide dieselbe Genotypisierungsstrategie verwendet werden. Die Sequenzen der verwendeten Genotypisierungsprimer HCN4_FEA_f und HCN4_FEA_r befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

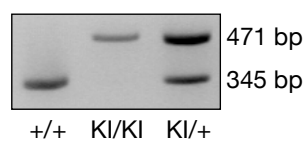


Abb. 4.28 Agarose-Gelelektrophorese einer Genotypisierungs-PCR der *HCN4^{Y527F}* Mauslinie. Vom wildtyp Allel entsteht ein PCR-Produkt von 345 bp Größe, von den knock-in Allelen *Y527F* oder *FEA* ein PCR-Produkt von 471 bp Größe. Die Genotypisierungs-PCR von heterozygoten Mäusen ergibt sowohl die wildtyp als auch die knock-in Bande.

4.9.2. Sequenzierung genomischer DNA der beiden generierten Mauslinien

Zum Nachweis der Mutationen im Genom der Nachfahren der chimären Mäuse wurden die entsprechenden Abschnitte des Exons 4 und Exons 7 von Mäusen der F1 Generation amplifiziert, die PCR Produkte aufgereinigt und sequenziert. Die verwendeten Primer

entsprachen denen, die auch für die Sequenzierung der Stammzell-DNA verwendet wurden. Die Sequenzierungen bestätigten bei beiden generierten Mauslinien das Vorhandensein der Mutationen (Abb. 4.29).

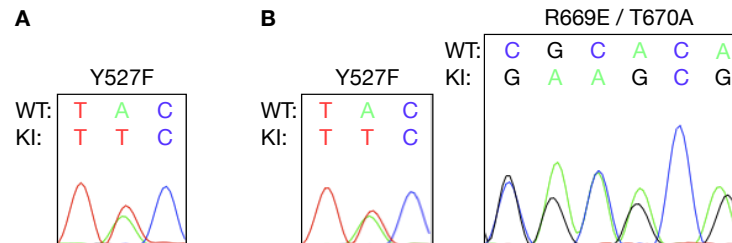


Abb. 4.29 Sequenzierung genomischer DNA heterozygoter Nachfahren der beiden generierten Mauslinien zum Nachweis der Mutationen. A, Sequenzanalyse der Linie $HCN4^{Y527F}$. B, Sequenzanalyse der Linie $HCN4^{FEA}$.

4.9.3. Southern Blot der $HCN4^{Y527F}$ Mauslinie

Die korrekte homologe Rekombination des Targetingkonstrukts in den nativen $HCN4$ Genlokus wurde durch Southern Blot Analyse genomischer DNA (isoliert aus einer kleinen Gewebeprobe aus dem Schwanz der Maus) von homozygoten Mäusen bestätigt (Abb. 4.30)

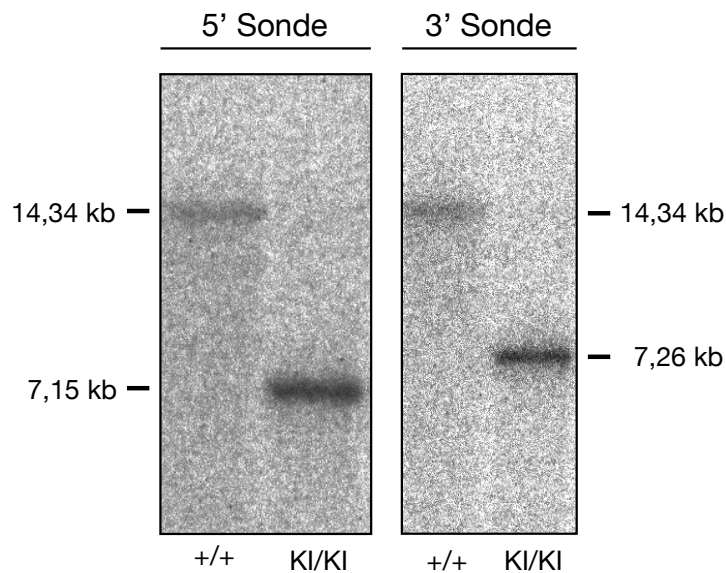


Abb. 4.30 Southern Blot der Mauslinie $Y527F$. Genomische DNA homozygoter knock-in (KI/KI) und wildtyp (+/+) Mäuse wurde mit dem Restriktionsenzym *SspI* verdaut. Nach Hybridisierung mit der 5' bzw. 3' Sonde wurden die richtigen Banden detektiert.

Die Southern Blots von homozygoten Mäusen der Y527F Mauslinie bestätigen die bereits in den ES Zellen gezeigte korrekte homologe Rekombination des Targeting Konstrukts.

4.9.4. Southern Blot der FEA Mauslinie

Zur Verifizierung der korrekten Integration des Targeting Konstruktes wurde von der FEA Mauslinie ebenfalls ein Southern Blot durchgeführt. Da zum Zeitpunkt des Experimentes noch keine homozygoten Nachfahren zur Verfügung standen, wurde der Southern Blot mit genomischer DNA der chimären Mäuse durchgeführt (Abb. 4.31)

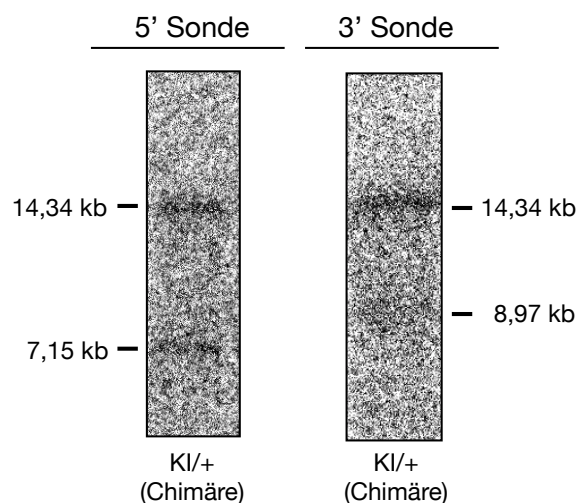


Abb. 4.31 Southern Blot der FEA Mauslinie. Genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *SspI* verdaut. Nach Detektion mit der 5' und 3' Sonde wurden die richtigen Banden detektiert. Die knock-in Bande der chimären Maus hat eine Größe von 8,97 kb, da in ihr die ACN Kasette noch nicht deletiert ist.

Der Southern Blot bestätigte auch in der chimären Maus, wie bereits zuvor in den ES Zellen gezeigt, die korrekte homologe Rekombination des Targeting Konstrukts.

4.9.5. Southern Blot der beiden Mauslinien mit der ACN Neo Sonde

Zum Nachweis des Fehlens der ACN Kasette in den beiden generierten Mauslinien wurde wiederum ein Southern-blot mit der ACN Neo Sonde durchgeführt. Für diesen Blot wurde das Enzym *BclI* verwendet, da das *DraI* Enzym die aus den Mäusen isolierte genomische DNA nicht geschnitten hatte. Bei Verdau mit *BclI* wird mit der ACN Neo Sonde eine Bande der Größe 18,0 kb detektiert. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA je einer embryonalen Stammzelle der HCN2 Mauslinie (Verdau mit *AflII*: 10,2 kb Fragment) und HCN4 Mauslinie verwendet. Der Southern Blot bestätigte das Fehlen

der ACN Kasette und somit die erfolgreiche Deletion dieser aus dem Genom der beiden Mauslinien (Abb. 4.32).

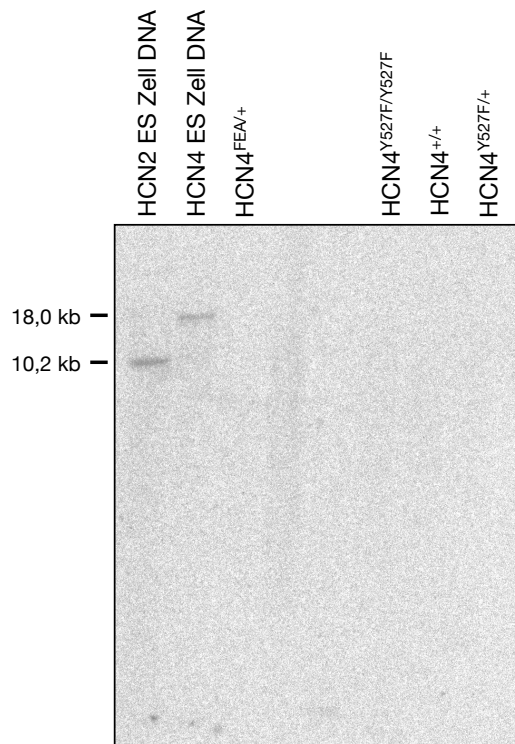


Abb 4.32 Southern Blot mit der ACN Neo Sonde. Verdau genomischer DNA der beiden Mauslinien und einer wildtyp Maus als Negativkontrolle mit dem Enzym BclI. Als Positivkontrolle diente genomische DNA aus HCN2 (verdaut mit AflII; Fragmentgröße: 10,2 kb) bzw. HCN4 ES Zellen (verdaut mit BclI; Fragmentgröße: 18,0 kb).

Zur Bestätigung der Ergebnisse des Southern Blots wurden zusätzlich PCR Analysen aus genomischer DNA der beiden Mauslinien durchgeführt. Dabei wurden spezifische Primer für die Cre-Rekombinase (Crefor und Crerev; Größe des PCR-Produktes: 400 bp) sowie für die ACN Neo Kasette (ACN_Neo_for und ACN_Neo_rev; Größe des PCR-Produktes: 784 bp) verwendet. Auch die PCR Analysen bestätigten die Deletion der ACN Kasette aus dem Genom der beiden Mauslinien (Abb. 4.33).

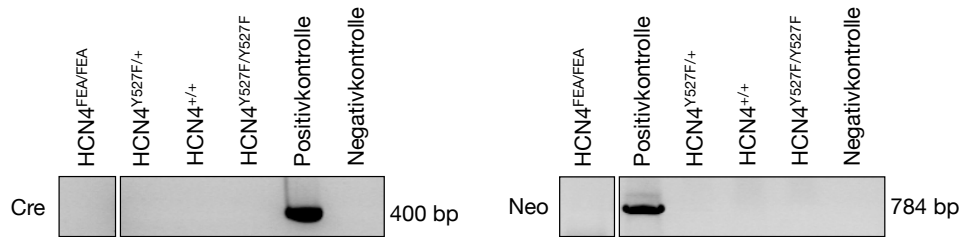


Abb. 4.33 PCR Analyse auf das Vorhandensein der Cre-Rekombinase (links) bzw. des Neomycin-Resistenzgens (rechts) im Genom der Mauslinien. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz mit der Lösung des Proteinase K Verdaus ohne Gewebezugabe. Als Positivkontrolle wurde jeweils genomische DNA von Mäusen verwendet, die das Cre-Gen bzw. das Neomycin-Gen im Genom integriert hatten. In beiden generierten Mauslinien ist die ACN Kassette deletiert, da weder das Cre- noch das Neomycin-Gen nachgewiesen werden konnte.

4.9.6. Nachweis des korrekten Spleißens und des Vorhandenseins der Mutationen auf mRNA Ebene durch RT-PCR

Zum Nachweis der korrekten Prozessierung der mRNA sowie des Vorhandenseins der Mutationen in der mRNA wurde zunächst RNA aus Gehirnen von Mäusen der Y527F sowie FEA Linie isoliert. Als Kontrolle diente RNA aus dem Gehirn einer wildtyp Maus.

Anschließend wurde die Konzentration der RNA bestimmt und eine RT-PCR durchgeführt um die RNA in cDNA umzuschreiben. Von der generierten cDNA wurde im Anschluss eine PCR mit folgenden HCN4 spezifischen Primern durchgeführt: HCN4_mRNA_Ex2_f und HCN4_mRNA_Ex8_r. Die Primer binden jeweils auf der Exon-Exon Grenze zwischen Exon 2 und 3 bzw. Exon 7 und 8, um eine Amplifikation eventuell vorhandener genomischer DNA zu vermeiden. Das entstehende PCR Produkt hat eine Größe von 899 bp. Zur Kontrolle wurde zusätzlich eine PCR mit GAPDH spezifischen Primern durchgeführt (Primer siehe Anhang; Größe des PCR-Produktes: 601 bp). Zur Analyse der Identität und Reinheit der PCR Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 4.34). Als Negativkontrolle diente ein PCR Ansatz, der mit Wasser durchgeführt wurde, das parallel zur RNA Isolation aus Gewebe und zur cDNA Synthese jeweils mit denselben Lösungen behandelt wurde. Es zeigte sich, dass in allen getesteten Mauslinien (WT, HCN4^{Y527F} und HCN4^{FEA}) auf mRNA Ebene die HCN4 Expression vergleichbar ist. Zusätzlich wurde durch die RT-PCR nachgewiesen, dass die Punktmutationen keinen Einfluss auf das Spleißen der mRNA haben, da jeweils das komplette mRNA Transkript von Exon 2 bis 8 nachgewiesen werden konnte.

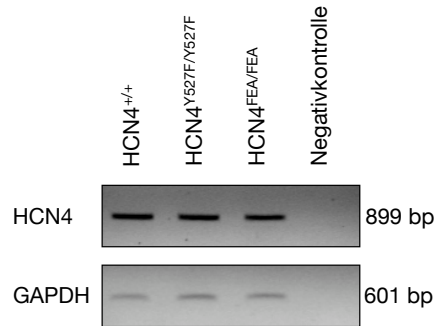


Abb. 4.34 PCRs von cDNA aus Gehirnen einer WT ($HCN4^{+/+}$) sowie je einer homozygoten $HCN4^{Y527F/Y527F}$ und $HCN4^{FEA/FEA}$ Maus. Es wurden jeweils Gen-spezifische Primer für $HCN4$ bzw. $GAPDH$ verwendet.

Die Sequenzierung der PCR-Produkte der homozygoten Mäuse bestätigte das Vorhandensein der Mutationen auch auf mRNA Ebene. Die verwendeten Primer waren dabei dieselben, die auch zur Generierung der PCR-Produkte verwendet wurden. Abb. 4.35 zeigt die Ergebnisse der Sequenzierung.

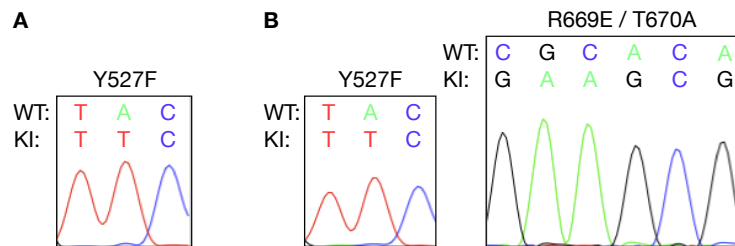


Abb. 4.35 Sequenzierung der cDNA homozygoter Mäuse zum Nachweis der Mutationen auf mRNA Ebene. Ergebnis der cDNA-Sequenzierungen der $Y527F$ Mauslinie (A) sowie der FEA Mauslinie (B).

4.9.7. Genereller Phänotyp der $HCN4^{Y527F}$ Mauslinie

Sowohl heterozygote als auch homozygote Mäuse der $HCN4^{Y527F}$ Mauslinie sind lebensfähig. Auf den ersten Blick sind keine morphologischen Veränderungen feststellbar.

4.9.8. Genereller Phänotyp der $HCN4^{FEA}$ Mauslinie

Wie bei der $HCN4^{Y527F}$ Mauslinie sind auch bei der $HCN4^{FEA}$ Mauslinie sowohl heterozygote, als auch homozygote Tiere lebensfähig. Die ersten geborenen homozygoten Mäuse der FEA Mauslinie unterschieden sich auf den ersten Blick nicht von ihren heterozygoten Geschwistern.

5. Diskussion

5.1. Klonierung des Targeting Vektors und Gentargeting

Im ersten Schritt der Arbeit wurde der Targeting Vektor für das folgende Gentargeting kloniert. Nach erfolgreichem Gentargeting und Analyse der veränderten embryonalen Stammzellen wurde festgestellt, dass der Targeting Vektor nur in wenigen Stammzellen vollständig in das Genom integriert wurde. Im Großteil der Fälle konnte entweder keine oder nur die Mutationen im Exon 4 oder 7 im Genom nachgewiesen werden. Da die ACN Kasette sich relativ symmetrisch in der Mitte zwischen den Exons 4 und 7 befindet (Abb. 4.2), ist die Tatsache erklärbar, dass mit ungefähr gleicher Häufigkeit die einzelnen Mutationen ins Genom integriert wurden. Bei der homologen Rekombination erfolgt die Integration der ACN Kasette sowie eines Teils der homologen Arme des Targeting Vektors in das HCN4 Gen. Je nachdem, wie groß der Abschnitt der integrierten homologen Arme des Targeting Vektors ist, werden die Mutationen zusammen mit der ACN Kasette ins Genom integriert oder nicht.

Bei beiden durchgeführten Gentargetings wurden je zwei Stammzellklone identifiziert, die sowohl die Mutation im Exon 4 als auch diejenigen im Exon 7 enthielten. Somit lag die Effizienz des Gentargetings für dieses Konstrukt bei 0,56 %.

Durch die verwendete Targeting-Strategie konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, mit nur einem Targeting Vektor mehrere *knock-in* Mauslinien zu generieren, die in unterschiedlichen Exons Mutationen tragen. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass auch Mäuse generiert werden können, die jeweils nur eine Mutation tragen, empfiehlt es sich, die Resistenzkasette symmetrisch zwischen zwei geplante Punktmutationen einzubauen.

5.2. Analyse der $HCN4^{FEA}$ und $HCN4^{Y527F}$ Mauslinien

Nach erfolgreicher Generierung chimärer Mäuse und Zucht mit wildtyp Mäusen sowie anschließender Verpaarung der F1 Generation untereinander wurden die ersten homozygoten Mäuse sowohl der $HCN4^{FEA}$ als auch der $HCN4^{Y527F}$ Mauslinie identifiziert. Die korrekte Integration des Targeting Konstrukts sowie das Vorhandensein der Mutationen wurde durch Southern Blot bzw. Sequenzanalyse genomischer DNA bestätigt. Darüber hinaus konnte durch RT-PCR Analyse nachgewiesen werden, dass das Spleißen der mRNA durch die Mutationen nicht beeinflusst wird. Zudem wurde das Vorhandensein der Mutationen auch auf mRNA Ebene bestätigt.

Beide Mauslinien sind lebensfähig. Homozygote HCN4^{FEA} und HCN4^{Y527F} *knock-in* Tiere zeigen im Vergleich zu ihren wildtyp Geschwistern auf den ersten Blick keine Auffälligkeiten bei der Entwicklung. Genauere Aussagen können allerdings erst nach der ausführlichen Phänotypisierung getroffen werden.

Besonders hervorzuheben ist die offenbar normale Embryonalentwicklung der HCN4^{FEA} Mauslinie, da die einzige bisher in der Literatur beschriebene *knock-in* Mauslinie mit cAMP-insensitivem murinen HCN4 Kanal (HCN4^{R669Q}) bereits während der Embryonalentwicklung stirbt (Harzheim, Pfeiffer et al. 2008). Die halbmaximale Aktivierungsspannung des I_h der HCN4^{R669Q} Mauslinie liegt negativ des physiologischen Potentialbereichs der Sinusknotenzellen, wodurch nur sehr wenige Kanäle im offenen Zustand vorliegen. Die niedrige Stromdichte des I_h der HCN4^{R669Q} Mäuse reicht offenbar für die normale embryonale Entwicklung des Herzens nicht aus. Der beobachtete Phänotyp der HCN4^{R669Q} Mäuse ähnelt dem der HCN4 *knockout* Mäuse, die ebenfalls während der Embryonalentwicklung sterben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Aktivierungskurve eines cAMP-insensitiven HCN4 Kanals durch Einfügen einer weiteren Punktmutation in den physiologischen Bereich zu verschieben und somit eine normale Embryonalentwicklung zu ermöglichen. Die zusätzlich in den C-Linker eingefügte Y527F Mutation bewirkt in heterologen Expressionssystemen eine Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung um ca. 10 mV hin zu positiveren Potentialen. Es wäre möglich, dass die Y527F Mutation auch *in vivo* eine Verschiebung der Aktivierungskurve bewirkt und somit für die normale Embryonalentwicklung der HCN4^{FEA} Mäuse mit verantwortlich ist.

Die Röntgenkristallstruktur des HCN4 C-Terminus liefert eine mögliche Erklärung der erleichterten spannungsabhängigen Aktivierung des HCN4 Kanals der HCN4^{FEA} Linie. Eine Lockerung des sogenannten *gating ring* des C-Terminus durch Bindung von cAMP führt zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals (Ulens und Siegelbaum 2003). Die Kristallstruktur des HCN4 C-Terminus lässt auf eine Interaktion des Tyrosin 527 in der A' Helix des C-Linkers mit dem Glutamat 556 der B' Helix schließen. Der Aminosäureaustausch von Tyrosin nach Phenylalanin (Y527F) führt dazu, dass diese Interaktion nicht mehr stattfinden kann, da Phenylalanin keine OH-Gruppe am Phenylring besitzt (Abb. 5.1). Dies könnte zur Abschwächung der Interaktion der A' Helix mit der B' Helix führen, was auch einen Einfluss auf die Interaktion der C-Linker der vier Kanal-Untereinheiten untereinander haben könnte. Normalerweise erfolgt die Interaktion der vier Untereinheiten über die Wechselwirkung der A' und B' Helices einer Untereinheit mit den C' und D' Helices der benachbarten Untereinheit. Durch Abschwächung dieser Interaktion könnte das spannungsabhängige *gating* des Kanals, ähnlich wie nach Bindung von cAMP erleichtert werden.

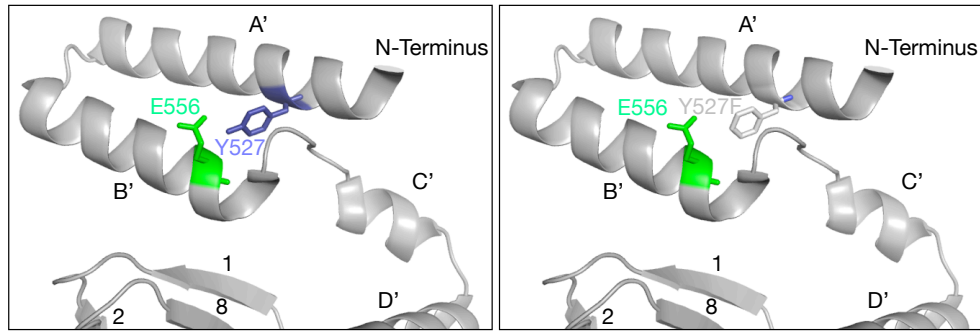


Abb. 5.1 Dreidimensionale Darstellung des C-Linkers des humanen HCN4 Kanals. Links, Wildtyp Proteinstruktur. Die Aminosäuren Tyrosin (Y527, blau) und Glutamat (E556, grün) wechselwirken miteinander. Rechts, Y527F Mutation. Nach Mutation des Tyrosins (Y527) zu Phenylalanin (Y527F, grau) ist diese Wechselwirkung aufgrund des Fehlens der OH-Gruppe am Phenylalanin nicht mehr möglich.

5.3. Ausblick

Mit der erfolgreichen Generierung der HCN4^{FEA} Mauslinie ist es erstmals möglich, die Rolle der cAMP-abhängigen Modulation des murinen HCN4 Kanals für die physiologische Herz- und Gehirnfunktion in erwachsenen Mäusen zu untersuchen. Zur genauen Analyse des kardialen sowie neuronalen Phänotyps sind verschiedene *in vivo* und *in vitro* Experimente geplant.

Telemetrische elektrokardiographische (EKG) Messungen werden zeigen, welche Rolle die cAMP-abhängige Modulation von HCN4 für die Aufrechterhaltung einer stabilen Herzfrequenz sowohl in Ruhe als auch unter körperlicher Belastung spielt. Darüber hinaus kann durch pharmakologische Stimulation z.B. mit Isoprenalin (einem Adrenalin-Derivat) der Einfluss der cAMP-abhängigen Modulation von HCN4 auf die Regulation der Herzfrequenz untersucht werden. Telemetrische Messungen haben den Vorteil, dass sich die Mäuse frei im Käfig bewegen können und somit die natürliche Regulation der Herzfunktion während physiologischer Ruhe- und Aktivitätsphasen aufgezeichnet werden kann.

Interessant wird dabei der Vergleich mit der transgenen Mauslinie HCN4-573X sein, die einen mutierten humanen HCN4 Kanal exprimiert, was ebenfalls zum Verlust der cAMP-Sensitivität des I_h führt (Alig, Marger et al. 2009). Dies äußert sich bei Patienten und im Mausmodell in einer basalen Bradykardie sowie verminderten maximalen Herzfrequenz. Die HCN4-573X Deletions-Mutation führt zu einem Stoppcodon in der kodierenden Sequenz der Schleife zwischen der C' und D' Helix des C-Linkers. Somit besitzen die mutierten Kanäle keine CNBD mehr und sind nicht mehr durch cAMP modu-

lierbar. Normalerweise würde man annehmen, dass der Verlust der CNBD eine Disinhibition des spannungsabhängigen *gating* zur Folge hat und damit eher eine Tachykardie als eine Bradykardie bewirken würde. Möglicherweise reicht der verkürzte C-Linker, bestehend aus den Helices A' bis C' aber aus, um das spannungsabhängige *gating* zu inhibieren. Dies würde auch die Bradykardie in Ruhe erklären.

Der Vorteil der in der vorliegenden Arbeit generierten HCN4^{FEA} Mauslinie besteht darin, dass lediglich Punktmutationen in den HCN4 Kanal der Maus eingefügt wurden und nicht ein Kanal einer anderen Spezies als Transgen exprimiert wird. Zudem ist in diesem Kanal der C-Terminus inklusive CNBD vollständig vorhanden.

Neben den *in vivo* Experimenten sind auch elektrophysiologische *in vitro* Experimente an isolierten Sinusknotenpräparaten sowie Einzelzellen des Sinusknotens geplant. Das Hauptaugenmerk wird dabei auf der Analyse der biophysikalischen Eigenschaften der veränderten HCN4 Kanäle liegen.

Der Verlust der cAMP-abhängigen Modulation des HCN4 Kanals könnte Auswirkungen auf die Oszillationen des thalamo-kortikalen Netzwerks haben, was sich auf Schlaf- und Wachheitszustand auswirken könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, sind telemetrische elektroenzephalographische (EEG) und elektromyographische (EMG) Messungen geplant. Wie in der Einleitung beschrieben spielt die cAMP-abhängige Modulation des I_h eine wichtige Rolle beim Wechsel von langsamen rhythmischen Oszillationen (*burst* Modus) während des Non-REM Schlafs hin zum *Transmission* Modus der Neuronen während des Wachzustandes bzw. REM-Schlafs. Ein besonderes Augenmerk wird deshalb die Analyse der Schlafphasen der Mäuse haben. Möglicherweise werden HCN4^{FEA} Mäuse Störungen im Muster der "Schlafspindeln" des Tiefschlafs und/oder Störungen beim Übergang vom Schlaf- in den Wachzustand und umgekehrt zeigen.

In Ergänzung zu den *in vivo* Messungen sind auch *in vitro* Messungen an Gehirnschnitten geplant. Mittels *whole-cell patch clamp* Technik können dabei die Ströme in einzelnen thalamischen Neuronen gemessen werden. Die biophysikalischen Auswirkungen der Mutationen, insbesondere auf die beiden unterschiedlichen Aktivitätsmuster thalamischer Neurone (*Burst*- und *Transmission* Modus) können damit detailliert untersucht werden.

Für die zweite generierte Mauslinie (HCN4^{Y527F}) sind dieselben Experimente geplant. Da in HCN4^{Y527F} Mäusen die cAMP-abhängige Modulation erhalten ist, dafür aber eine konstante Verschiebung der Aktivierungskurve des HCN4 Kanals vorliegt, ist ein anderer Phänotyp zu erwarten. Man würde annehmen, dass HCN4^{Y527F} Mäuse aufgrund der Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung hin zu positiveren Potentialen eine Erhöhung der basalen Herzfrequenz aufweisen. Pathophysiologisch könnte dieses Mausmodell die Untersuchung der Auswirkungen einer erhöhten Schrittmacher-Aktivi-

tät auf die Funktion des kardiovaskulären Systems ermöglichen. Eine erhöhte Schrittmacheraktivität geht mit einem erhöhten Risiko für ektope Erregungen einher, was zum Auftreten atrialer oder ventrikulärer Arrhythmien führen könnte.

HCN4Y527F Mäuse könnten aufgrund der Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve des HCN4 Kanals ebenfalls Störungen der thalamo-kortikalen Oszillationen des Gehirns aufweisen. Elektroenzephalographische Messungen werden zeigen, ob sich das möglicherweise in verändertem Schlaf- bzw. Wach-Verhalten äußert.

6. Zusammenfassung

HCN4 Kanäle gehören zu einer kleinen Genfamilie mit insgesamt vier Isoformen (HCN1-4). Sie werden durch Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert und durch zyklische Nukleotide moduliert. Der von ihnen geleitete Kationenstrom (I_h), trägt zur Depolarisation der Zellmembran spontan aktiver Zellen bei. Unter anderem ist er an der Entstehung von Aktionspotentialen in Sinusknotenzellen und damit des autonomen Herzschlags beteiligt. Im Gehirn ist I_h an der Entstehung rhythmischer Oszillationen in Neuronen des Thalamus beteiligt, die den Wechsel zwischen verschiedenen Schlaf- bzw. Wachheitszuständen steuern.

Eine wichtige biophysikalische Eigenschaft des I_h ist das sogenannte *duale gating*. Darunter versteht man die Eigenschaft, dass der Strom durch Hyperpolarisation aktiviert wird und dabei gleichzeitig durch zyklische Nukleotide (wie beispielsweise cAMP) moduliert wird. Bindung von cAMP an den Kanal ohne vorliegende Hyperpolarisation löst keine Aktivierung des Kanals aus. Das *gating* durch Hyperpolarisation sowie durch cAMP-Bindung tritt stets gleichzeitig auf, weshalb es mit klassischen Methoden, wie beispielsweise pharmakologischer Blockade des Kanals nicht möglich ist, die beiden Prozesse unabhängig voneinander zu untersuchen. Für die eindeutige Klärung der physiologischen Funktion der cAMP-abhängigen Modulation von HCN4 sowohl für die physiologische Herz-, als auch Gehirnfunktion ist dies aber von entscheidender Bedeutung.

Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein neues Mausmodell (HCN4^{FEA}) generiert, das HCN4 Kanäle exprimiert, die gegenüber cAMP insensitiv sind. Zudem enthält der mutierte HCN4 Kanal eine zusätzliche Mutation im Bereich des C-Linkers (Y527F), die eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve des Kanals in den physiologischen Bereich bewirkt. Diese zusätzliche Mutation wurde eingefügt, da aus einem früheren Mausmodell bekannt ist, dass die alleinige Mutation der CNBD zu Kanälen führt, deren Aktivierungskurve so weit negativ des physiologischen Potentialbereichs liegt, dass dies einem funktionellen *knockout* des Kanals gleichkommt. Mäuse mit alleiniger Mutation der CNBD sterben bereits während der Embryonalentwicklung (Harzheim, Pfeiffer et al. 2008).

Wie sich gezeigt hat, sind homozygote HCN4^{FEA} Mäuse tatsächlich lebensfähig und zeigen auf den ersten Blick eine normale Entwicklung. Die Hypothese, dass durch eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve in den physiologischen Potentialbereich eine normale Embryonalentwicklung ermöglicht werden könnte, wurde damit bestätigt. Die in dieser Arbeit generierte HCN4^{FEA} Mauslinie ermöglicht somit zum ersten mal die Untersuchung der Rolle der cAMP-abhängigen Modulation von HCN4 für die physiologische Herz- und Gehirnfunktion in erwachsenen Mäusen.

7. Literaturverzeichnis

- Alig, J., L. Marger, et al. (2009). "Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels." Proc Natl Acad Sci USA **106**(29): 12189-12194.
- Baruscotti, M., A. Bucchini, et al. (2011). "Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene Hcn4." Proc Natl Acad Sci USA **108**(4): 1705-1710.
- Biel, M., C. Wahl-Schott, et al. (2009). "Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function." Physiol Rev **89**(3): 847-885.
- Bollag, R. J., A. S. Waldman, et al. (1989). "Homologous recombination in mammalian cells." Annual review of genetics **23**: 199-225.
- Brown, H. F., D. DiFrancesco, et al. (1979). "How does adrenaline accelerate the heart?" Nature **280**(5719): 235-236.
- Brown, H. F., D. DiFrancisco, et al. (1979). "Adrenaline action on rabbit sino-atrial node [proceedings]." The Journal of physiology **290**(2): 31P-32P.
- Bunting, M., K. E. Bernstein, et al. (1999). "Targeting genes for self-excision in the germ line." Genes Dev **13**(12): 1524-1528.
- Craven, K. B. und W. N. Zagotta (2004). "Salt bridges and gating in the COOH-terminal region of HCN2 and CNGA1 channels." The Journal of general physiology **124**(6): 663-677.
- Deng, C. und M. R. Capecchi (1992). "Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus." Molecular and cellular biology **12**(8): 3365-3371.
- DiFrancesco, D. (2010). "The role of the funny current in pacemaker activity." Circ Res **106**(3): 434-446.
- DiFrancesco, D., P. Ducouret, et al. (1989). "Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations." Science **243**(4891): 669-671.
- DiFrancesco, D. und P. Tortora (1991). "Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP." Nature **351**(6322): 145-147.
- DiFrancesco, D. und C. Tromba (1988a). "Inhibition of the hyperpolarization-activated current (if) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes." The Journal of physiology **405**: 477-491.
- DiFrancesco, D. und C. Tromba (1988b). "Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes." The Journal of physiology **405**: 493-510.

- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, et al. (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity." Science **280**(5360): 69-77.
- Evans, M. J. und M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-156.
- Fain, G. L., F. N. Quandt, et al. (1978). "Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse." Nature **272**(5652): 466-469.
- Fenske, S., R. Mader, et al. (2011). "HCN3 Contributes to the Ventricular Action Potential Waveform in the Murine Heart." Circulation research.
- Gauss, R., R. Seifert, et al. (1998). "Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm." Nature **393**(6685): 583-587.
- Gu, H., J. D. Marth, et al. (1994). "Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting." Science **265**(5168): 103-106.
- Hagiwara, N., H. Irisawa, et al. (1988). "Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells." The Journal of physiology **395**: 233-253.
- Halliwel, J. V. und P. R. Adams (1982). "Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons." Brain research **250**(1): 71-92.
- Harzheim, D., K. H. Pfeiffer, et al. (2008). "Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP." EMBO J **27**(4): 692-703.
- Herrmann, S., L. Fabritz, et al. (2011). "Insights into sick sinus syndrome from an inducible mouse model." Cardiovasc Res.
- Herrmann, S., B. Layh, et al. (2011). "Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: An expression study in the mouse heart." Journal of molecular and cellular cardiology **51**(6): 997-1006.
- Herrmann, S., J. Stieber, et al. (2007). "HCN4 provides a 'depolarization reserve' and is not required for heart rate acceleration in mice." EMBO J **26**(21): 4423-4432.
- Hoesl, E., J. Stieber, et al. (2008). "Tamoxifen-inducible gene deletion in the cardiac conduction system." J Mol Cell Cardiol **45**(1): 62-69.
- Jiang, Y., A. Lee, et al. (2003). "X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel." Nature **423**(6935): 33-41.
- Lakatta, E. G., V. A. Maltsev, et al. (2003). "Cyclic variation of intracellular calcium: a critical factor for cardiac pacemaker cell dominance." Circulation research **92**(3): e45-50.

- Lakatta, E. G., T. M. Vinogradova, et al. (2002). "Beta-adrenergic stimulation modulation of heart rate via synchronization of ryanodine receptor Ca^{2+} release." Journal of cardiac surgery **17**(5): 451-461.
- Lolicato, M., M. Nardini, et al. (2011). "Tetramerization dynamics of the C-terminal domain underlies isoform-specific cAMP-gating in Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide gated channels." The Journal of biological chemistry.
- Long, S. B., E. B. Campbell, et al. (2005a). "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K^{+} channel." Science **309**(5736): 897-903.
- Long, S. B., E. B. Campbell, et al. (2005b). "Voltage sensor of $\text{Kv}1.2$: structural basis of electromechanical coupling." Science **309**(5736): 903-908.
- Ludwig, A., T. Budde, et al. (2003). "Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel $\text{HCN}2$." EMBO J **22**(2): 216-224.
- Ludwig, A., X. Zong, et al. (1998). "A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels." Nature **393**(6685): 587-591.
- Lüthi, A. und D. A. McCormick (1998). "Periodicity of thalamic synchronized oscillations: the role of Ca^{2+} -mediated upregulation of I_h ." Neuron **20**(3): 553-563.
- Mangoni, M. E., B. Couette, et al. (2006). "Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes." Progress in biophysics and molecular biology **90**(1-3): 38-63.
- Mangoni, M. E. und J. Nargeot (2008). "Genesis and regulation of the heart automaticity." Physiol Rev **88**(3): 919-982.
- Mannikko, R., F. Elinder, et al. (2002). "Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages." Nature **419**(6909): 837-841.
- McCormick, D. A. und T. Bal (1997). "Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms." Annu Rev Neurosci **20**: 185-215.
- McCormick, D. A. und H. C. Pape (1990). "Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones." J Physiol (Lond) **431**: 291-318.
- Mery, A., F. Aimond, et al. (2005). "Initiation of embryonic cardiac pacemaker activity by inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent calcium signaling." Molecular biology of the cell **16**(5): 2414-2423.
- Mistrić, P., R. Mader, et al. (2005). "The murine $\text{HCN}3$ gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides." J Biol Chem **280**(29): 27056-27061.

- Mitsuiye, T., Y. Shinagawa, et al. (2000). "Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells." Circulation research **87**(2): 88-91.
- Moosmang, S., M. Biel, et al. (1999). "Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain." Biol Chem **380**(7-8): 975-980.
- Moosmang, S., J. Stieber, et al. (2001). "Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues." Eur J Biochem **268**(6): 1646-1652.
- Much, B., C. Wahl-Schott, et al. (2003). "Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels." J Biol Chem **278**(44): 43781-43786.
- Noma, A. und H. Irisawa (1976). "Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method." Pflügers Archiv : European journal of physiology **364**(1): 45-52.
- Notomi, T. und R. Shigemoto (2004). "Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain." J Comp Neurol **471**(3): 241-276.
- Orban, P. C., D. Chui, et al. (1992). "Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(15): 6861-6865.
- Sambrook, J. und D. W. Russell (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoro, B., S. Chen, et al. (2000). "Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **20**(14): 5264-5275.
- Santoro, B., S. G. Grant, et al. (1997). "Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels." Proc Natl Acad Sci USA **94**(26): 14815-14820.
- Santoro, B., D. T. Liu, et al. (1998). "Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain." Cell **93**(5): 717-729.
- Schulze-Bahr, E., A. Neu, et al. (2003). "Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease." J Clin Invest **111**(10): 1537-1545.
- Shi, N., S. Ye, et al. (2006). "Atomic structure of a Na⁺- and K⁺-conducting channel." Nature **440**(7083): 570-574.

- Shi, W., R. Wymore, et al. (1999). "Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues." Circ Res **85**(1): e1-6.
- Smithies, O., R. G. Gregg, et al. (1985). "Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination." Nature **317**(6034): 230-234.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." Journal of molecular biology **98**(3): 503-517.
- Steriade, M. und I. Timofeev (2003). "Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations." Neuron **37**(4): 563-576.
- Stieber, J., S. Herrmann, et al. (2003). "The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart." Proc Natl Acad Sci USA **100**(25): 15235-15240.
- Stieber, J., F. Hofmann, et al. (2004). "Pacemaker channels and sinus node arrhythmia." Trends in cardiovascular medicine **14**(1): 23-28.
- Talts, J. F., C. Brakebusch, et al. (1999). "Integrin gene targeting." Methods in molecular biology **129**: 153-187.
- Thomas, K. R., K. R. Folger, et al. (1986). "High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome." Cell **44**(3): 419-428.
- Ulen, C. und S. A. Siegelbaum (2003). "Regulation of hyperpolarization-activated HCN channels by cAMP through a gating switch in binding domain symmetry." Neuron **40**(5): 959-970.
- Vinogradova, T. M., A. E. Lyashkov, et al. (2006). "High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca²⁺ store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells." Circulation research **98**(4): 505-514.
- Xu, X., Z. V. Vysotskaya, et al. (2010). "Structural basis for the cAMP-dependent gating in the human HCN4 channel." The Journal of biological chemistry **285**(47): 37082-37091.
- Yu, F. H. und W. A. Catterall (2004). "The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis." Science's STKE : signal transduction knowledge environment **2004**(253): re15.
- Zagotta, W. N., N. B. Olivier, et al. (2003). "Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels." Nature **425**(6954): 200-205.

Zhou, Y., J. H. Morais-Cabral, et al. (2001). "Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution." Nature **414**(6859): 43-48.

8. Abkürzungsverzeichnis

SI-Einheiten sowie davon abgeleitete Einheiten werden nicht extra im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

BSA	bovines Serum Albumin
bp	Basenpaar(e)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNBD	<u>c</u> yclic <u>n</u> ucleotide <u>b</u> inding <u>d</u> omain, Zyklonukleotidbindungsdomäne
CNG	<u>c</u> yclic <u>n</u> ucleotide-gated (channel)
cpm	counts per minute, Zerfälle pro Minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES Zelle(n)	embryonale Stammzelle(n)
x g	x-fache Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCN	<u>h</u> yperpolarization-activated <u>c</u> yclic <u>n</u> ucleotide-gated (channel)
hHCN4	humanes HCN4 Gen bzw. Protein
I _h	hyperpolarisations-aktivierter Strom
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KI	knock-in
KO	knockout
l	Liter
mHCN2	murines HCN2 Gen bzw. Protein

mHCN4	murines HCN4 Gen bzw. Protein
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
PCR	Polymerasekettenreaktion
REM-Schlaf	rapid eye movement
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per <u>minute</u> , Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE Puffer	Tris Borsäure EDTA Puffer
TE Puffer	Tris EDTA Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
μ l	Mikroliter
V _{0.5}	halbmaximale Aktivierungsspannung
WT	wildtyp

9. Anhang

9.1. Verwendete Plasmide

pBlueskript II SK (-) (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

pGEM9 (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)

pIND (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

9.2. Verwendete Primer

Sämtliche Primer wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bestellt. Die Sequenz der Primer ist stets von 5' nach 3' dargestellt.

<i>Primer</i>	<i>Strang</i>	<i>Sequenz</i>
---------------	---------------	----------------

Amplifikation der genomischen Region um Exon 3 und Exon 4

HCN_sub_f_NEU	plus	CAATGTGAGGGTGGGTTCTG
HCN4_sub_CG2r	minus	AAGACCACACCAGGAGATAC
HCN_sub_CG1f	plus	CTTGAGACACTTTGGAGACG
HCN4_sub_CG3r	minus	CACTGACTAGCTAGCTAGAATTCTCTCC- CACTTTCT

Mutationsprimer für die Quikchange PCR zum Einfügen der Y527F Mutation

HCN4_Y527F_f	plus	CCGGCGCCAGTTCCAGGAGAAG
HCN4_Y527F_r	minus	CTTCTCCTGGAAGTGGCGCCGG

Primer zur Generierung der Southern Blot Sonden

HCN4_5'_So_for	plus	CTGTCTATTCATGTGTCCTGG
HCN4_5'_So_rev	minus	GACAGGGACTGGTAGCTTCC
HCN4_3'_So_for	plus	GTGAGGTTTCACAGGGAAACC

HCN4_3'_So_rev	minus	GCCTAGGCAAGCAGTGATGG
ACN_Neo_for	plus	AGGCGATAGAAGGCGATGCG
ACN_Neo_rev	minus	TGGGATCGGCCATTGAACAAGATG

Primer zur Sequenzierung des Targeting Vektors

pBlueMCSCGfor	plus	TTCGCTATTACGCCAGCTGG
pGem9MCS_f	plus	ATTACGCCAGCTGGCGAAAG
pGem9MCS_r	minus	AGCTCACTCATTAGGCACCC
HCN4-Ex3_f	plus	ACCTCATTGGCATGATGCTTCT
HCN4_In3_4_r	minus	CGCATTTGACAGTATCATCAAAC
HCN4_seq_Ex3_1f	plus	AAGAAGAGGCAGGACCTGAG
HCN4_seq_Ex3_2f	plus	ATGCCCTCAGCATGTTGATC
HCN4_seq_Ex3_3f	plus	TTCCTTCTAGCACAAGAAGTC
HCN4_seq_Ex3_4f	plus	TGTGGTCTGAAGGCAAATCC
HCN4_seq_Ex4_1f	plus	AGTATTCCTACGCCCTCTTC
HCN4_seq_Ex78_1r	minus	CACATGGTAGGAGAGACTTG
HCN4_seq_Ex56_1f	plus	AGGCTGCCTCTGTCACAATG
HCN4_seq_Ex56_2f	plus	TGACTCCAATATGCTTAGAGG
HCN4_seq_Ex56_3f	plus	CACACAGTTCCCTGACCTTC
HCN4_Ex7*8_1f	plus	AGCTAAGCTAGAGGGATACC
HCN4_Ex7*8_2f	plus	CTAGACACCCAGTTGATAGG
HCN4_Ex7*8_3f	plus	CCCCACGCCTGTTATATGG
HCN4_Ex7*8_4f	plus	CATCCAGCCCTGGGCAG
HCN4_Ex7*8_5f	plus	AGCCGCCTCTTCTGGAG
HCN4_Ex7*8_6f	plus	GCCCTTGAGGGCCTTG
HCN4_Ex7*8_7f	plus	GTCTGAGCTGCAAATCAACC
HCN4_Ex7*8_8f	plus	GGGGAGACATAGAGGATGG
HCN4_Ex7*8_4fn	plus	AGCCTCCTGGAGAGTTGTCC
HCN4_Ex7*8_5fn	plus	TCTGAGCCAGTACGCTCCAAAC

HCN4_Ex7*8_5fnn	plus	AAAGACAGCAGAAAATAACCAGG
HCN4_Ex7*8_5fx	plus	CCAAGTTCCTTGGGACACACAG

Primer zur Sequenzierung des pACN Plasmids sowie der ACN Kasette

pACN_1f	plus	GGTTTTCCCAGTCACGACG
pACN_2f	plus	TCGCTTGGTGGTCGAATGG
pACN_3f	plus	ACCGCCCTACACGGAGC
pACN_4f	plus	TTGCCGCTCAGCTTTACAG
pACN_5f	plus	TACCCCCAGGCTAAGTGC
pACN_6f	plus	ATCGACCGGTAATGCAGG
pACN_7f	plus	CTGCAACACCTGCCTGC
pACN_3fn	plus	CGCTTCTGAGGAGAGAACTG
pACN_3fx	plus	ACAGGAGGAGGAGAATGTCC
pACN_NCBI_3f	plus	TGGTTGGGTGTTCTTTCTGA
pACN_4r	minus	GGATAGTGAAACAGGGGCAA

Nachweis der Mutationen in den ES Zellen sowie Mauslinien

ES_cell_Ex4mut_f	plus	ATCACGACCACCATGAGTTCC
ES_cell_Ex4mut_r	minus	CATCGCCTTCTATCGCCTTC
ES_cell_Ex4_r	minus	GCTGGGCTGGTGATGCCAGG
ES_cell_Ex4_fn	plus	AACTGTGGAGCCCTGTGCCT
ES_cell_Ex4_rn	minus	GGAAGGAAGGGCGTGTGCGG
ES_cell_Ex7mut_f	plus	ACCATTGTCCACTTGTCCC
ES_cell_Ex7mut_r	minus	GTTGAAGACGCCTGAGTTG

Sequenzierung des 5'- und 3'-Endes der Targeting-Region in den ES Zellen

TV_5'_for	plus	TGCGTCTCTCTGTATGTGATTCCTTG
TV_5'_rev	minus	AGTCTGGGAGACGCTGGGGG
TV_3'_for	plus	GCAGGTTTGGCCCTGGGGTG

TV_3'_rev minus CAGGCCTCACGCTCCCATGC

Genotypisierungsprimer für Cre-Rekombinase

Crefor	plus	GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG
Crerev	minus	GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC

Amplifikation und Sequenzierung von mRNA

HCN4_mRNA_Ex2_f	plus	GCCTCTTGAGGCTTTCCCGCC
HCN4_mRNA_Ex8_r	minus	GGTCGTGCTGCACCTTGTGGA
GAPDH_Maus_for	plus	GGCAAATTCAACGGCACAGTCA
GAPDH_Maus_rev	minus	GTTTCTCCAGGCGGCACGTCA

9.3. Verwendete modifizierte Oligonukleotide

<i>Name</i>	<i>Strang</i>	<i>Sequenz (inklusive Modifikation)</i>
-------------	---------------	---

Hilfsvektor HVCG1

CGHV1for	plus	5'-Phosphat- CGCGCGGCGCGCCATGCATTGGTTCTGCAGTTC TTAAGAAGGAAAAAAGCGGCCGCG
CGHV1rev	minus	5'-Phosphat- CGCGCGCGGCCGCTTTTTTCCTTCTTAAGAACT GCAGAACCAATGCATGGCGCGCCG

BsmI-Insert

BsmI_Insert_for	5'-Phosphat-CTAGTGAATGCCA
BsmI_Insert_rev	5'-Phosphat-CTAGTGGCATTCA

Hilfvektor HVACN2

HVACN2_for 5'-Phosphat-
CGCGCGAATGCCAATATTGGATCCCTCGAGGGA
TCCTAGCTAGCTAGAATGCCG

HVACN2_rev 5'-Phosphat-
CGCGCGGCATTCTAGCTAGCTAGGATCCCTCGA
GGGATCCAATATTGGCATTCCG

9.4. Sequenz des Targeting Vektors

Eingezeichnet sind die Exons 3 bis 8 (rot hinterlegt) sowie wichtige Restriktions-schnittstellen, die zwei loxP Seiten der ACN Kasette und eingefügten Mutationen.

Unterschiede im Vergleich zur bei Ensembl.org veröffentlichten Sequenz des murinen HCN4 Gens (Gen-Nummer: ENSMUSG00000032338) sind blau hinterlegt und mit Kommentaren versehen.

SEQ TV: 17489 bp;

Composition 3953 A; 4860 C; 4562 G; 4114 T; 0 OTHER

Percentage: 22.6% A; 27.8% C; 26.1% G; 23.5% T; 0.0%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 5393.38 dsDNA: 10782.65

ORIGIN

```
1      CTGACGCGCC CTGTAGCGGC GCATTAAGCG CGGCGGGTGT GGTGGTTACG CGCAGCGTGA
61     CCGCTACACT TGCCAGCGCC CTAGCGCCCC CTCCTTTCGC TTTCTTCCCT TCCTTTCTCG
121    CCACGTTTCG CCGCTTTCCC CGTCAAGCTC TAAATCGGGG GCTCCCTTTA GGGTTCCGAT
181    TTAGTGCTTT ACGGCACCTC GACCCCAAAA AACTTGATTA GGGTGATGGT TCACGTAGTG
241    GGCCATCGCC CTGATAGACG GTTTTTCGCC CTTTGACGTT GGAGTCCACG TTCTTTAATA
301    GTGGACTCTT GTTCCAAACT GGAACAACAC TCAACCCTAT CTCGGTCTAT TCTTTTGATT
361    TATAAGGGAT TTTGCCGATT TCGGCCTATT GGTTAAAAAA TGAGCTGATT TAACAAAAAT
421    TTAACGCGAA TTTTAACAAA ATATTAACGC TTACAATTTT CATTCGCCAT TCAGGCTGCG
481    CAACTGTTGG GAAGGGCGAT CGGTGCGGGC CTCTTCGCTA TTACGCCAGC TGGCGAAAGG
541    GGGATGTGCT GCAAGGCGAT TAAGTTGGGT AACGCCAGGG TTTTCCAGT CACGACGTTG

      BssHII NotI      EcoRI
601    TAAAACGACG GCCAGTGAGC GCGCGCGGCC GCGCACTGTG TGATATCTG CAGGAATTCCT
661    TTGTGCTGTA CTAGGAGGCA GGCTGCCTC TGCGGTTCCC TGAGTGGTTC TGCTGTCTTA
721    CCTGAAATGA CCTCTGTCTC TCATGCCAGT GTCTTAGGGA CATCAGACTG AGAACTCATA
781    TACTCTGAGG TCTCTAGACG CAGCTTCCCT TCTGAAATGG GTTTGGATCT GAAGTGCCAT
841    CTATTGGTTT GTAATTTGGA CCCCACCCTT CCTATCCAGG AGTAATATAT TTTCTTGGGA
901    TAGTATGAAG GTATCAGAAC TAGGGACAGA GAGCTGGAGA GCGCCAGCGT TCTCCAGAC
961    TAGAGGCTAG AACTTGTGCA TGCTCCCTGG GCTTTTCCCA ACCTCTCTCT ATCCCTCAA
1021   GGCTGTAACC TTGGGCTCAA GTCTCTGCCA TACATTGGTG CACGGCAGCA TTGGAAGAAG
1081   AGGCAGGACC TGAGAGGCTA GGCTACACCC ATCCTGGCCA GGCCCTGCCA CACTGTAGCT
1141   TCGCACACAG AACCACACAC AGGGGTGGGC AGTCTGCAGC AGGCTGGGGT GTAGGTACTG
1201   CTGCAACTGA TTCAAGTGTA AGAAATAGCA GTATTACTAA TGCGTATGAA CTAATCATGA
1261   AGATTAATTG TTAATAACAT TGTCTCATAA TGGCTTGTA TTTATTGAAT ACGTCTATAC
1321   TCAGAACTAA GTACTTCGTA TGTATAATTT AATCATTTTG ACAACCACTC AGTTACCAAT
1381   TTTTCTCAGC ATTTTCCACT GGAGGAAACA TGCTCAGAGA AGTGTGGGGA TTTCTCAGG
1441   GCGACACAGC TAGGAGTTTG GTCAGAACTA GGCTTGGGTT CGAGATCTAC CCGAGCATGA
1501   AGCCTGTGGG CCCTTGCTGA CCCTTTGCTG TTTCCAGGGC CGGGCCCTGA TGTCTAGTA
1561   ATGGATTTAG GGAGGACTAA TGGCCGGGAC CTGACTTCAG AACATGATTC AAAGTGTGCT

      A>G Mutation
1621   TCGGGCTAGG TGGCTTCTCC CGGGAGTCCT CATGCCCTCA GCATGTTGAT CAGGCGGCCT
1681   CTCTGCCCAC TTCTTGTCTT GGATAGCTGC ACCTCCCATG GGAGAATATC TGCATCCGCA
1741   TAGATGCCAG GCGTGTGTC ATGGTGCCCT CCAGCCCGCC TCTTCTGGGT CTGCTTAGT
```

1801	GTATTCCCTC	CCCAGCCCCG	CCCCGCACAC	ACCCACTCTG	ACCGCTTACT	TGTCTGTGCC
		Exon 3				
1861	ATGGCTCGAC	TCCACAGATC	TTCCACATGA	CCTATGACCT	GGCCAGCGCC	GTGGTACGCA
1921	TCGTGAACCT	CATTGGCATG	ATGCTTCTGC	TGTGTCACTG	GGATGGCTGC	CTGCAGTTCC
1981	TAGTGCCCAT	GCTGCAGGAC	TTCCCCCATG	ACTGCTGGGT	GTCCATCAAT	GGCATGGTGG
2041	TAAGTATACA	TCACTGCCAC	GCTGGGCTAG	ACGTCTCCTC	TCTAGAAGCA	GGGATGGGTA
2101	GAGAGGCTGT	GCAGCTCCTG	AATCCCAGCA	GGTGGCACC	TGAGATGCTG	GCCTCGAACC
2161	TAAGGACACA	CAGCCCTGTC	CTTTTCATGT	CGAGCTTTTC	CTTCTAGCAC	AAGAAGTCAT
2221	TCACAGAACT	CTTGCTGGAG	TTGTGCATCT	AGCTTTTTTT	CTTATCTAGC	CATGCATTTT
2281	TGACAGCTGG	GCTGGCTTTA	CCACAGAGAC	TAAGACCTGG	GCTACTACTA	CTCTGTGTTG
2341	TGATCATGGG	ACAAAAGTAG	GCTGATGGCT	CCTATCTCCC	TCACCATGCT	GCCTAGAAAGC
2401	TGAGCTGAGA	GAACCAAAGG	CCACAAGGGC	ACTGTTAGCA	GCATAGGTAG	ACTCCACGCT
2461	TGTGCACAGC	CTCTGTGCTC	TAAGGGCAGA	GCTGAGTGTC	CCAACGCCCT	AAAGAGACCC
2521	ACACACCAGC	CCTCCTGGGC	AGGGCTGAGC	ATGGCGTGTG	GGCAGACTGC	AGGATGACTC
2581	TCTCCAACAT	TGTGCATGGG	TGAGAGAATT	GGGTTTGATG	CTTCCAAAAG	CCTTAGAACA
2641	GAGCCCCGAC	CTACAGAAAG	GGTTTCCCAA	GAAGCGATCC	CTGTGGGTAT	TTCTCTGGCA
2701	CCGCTGAACC	CCTGCCTCTC	CTGCTATTCA	GCGTGGTGTG	GTCTGAAGGC	AAATCCCCAG
2761	GGTCCCGTGG	GATGAACAAC	TGGCTTTGAA	AGAGGTGAAA	GAGACCCCGA	GGCAGCTTCA
2821	GAACCAGGCA	GGCCTTTACA	GAATAGCCTT	CTGATGAGCT	AATAAGTGAA	TCTGCCATAT
2881	GGGTGGAATT	TCCCCTGTTC	CCAGAGGCTT	AGCAGTGAGG	TGGGAACCCC	TGACAGAAGA
2941	CAGCTAGGGG	CTGCCCTAAG	GCTGGGGCCA	AGGCCTCTTT	CACCCCGGGG	TAAATAGTCC
3001	TACCCACCCC	ACCCTAGTGT	GGTTTGAACC	ACAGGCTCCA	CAAATGAGCC	CAGCTCTAGG
3061	CACGATGGTG	ACCTTGAACT	TGGCCAGGCG	CTGGTTTGAT	GTCTCCAGA	TGCTGCAGGC
3121	CTGCTTAGGG	ACCTAGGCAC	AGGCTCTGTG	GACTTTACAT	TGCTCCCAAC	ACCTTGCTT
3181	CTGAGTGGAA	ACACGGGAGG	TGGGGGGAAG	GGCCAGGAGT	GGGGTGCAGC	TGGTGATCCT
3241	TCTTACGGGG	GGGGCATTTT	TCTATGCGTG	TGAACATAAC	AGGCCACAC	AGGCACTAAA
3301	TTCAAGAGGT	GGCCTTTCTG	AGACCCTGCT	CCCACAAGGA	GCCTCCCTTG	AGACACTTTG
3361	GAGACGAAAA	TAGTCAAGAG	CCTCCCTCCC	TGATTCCATC	TTCCCGGCTC	ACACAATATA
3421	CCCAGGAGAG	TCCACCTTTA	GGGGCAGGGG	CAGGAGAATC	AGGGGCTGAG	GCCCTGGGCA
3481	GACAAGCAGG	GTTCTGAGAG	CATAGGAAGC	TCCAACGTGT	GCTCACCCAA	AAGGAGGACA
3541	GTGAAGTCGG	CTCCTGCAGA	GCCATTCCCC	TAGGGGAAGC	ATTGCTAGCT	TTATAATTGA
3601	GGTCAGTGGG	GAAATGGGCT	CGACTTGCCA	GCTGTTTAGG	GATAGGGATG	GAGCTACTTA
3661	GTAAGGGAAA	GACAGCAGGG	TGGCTCAGCT	TGGGACCATA	TGCGACCCAG	CCATGAGAAT
3721	TTAGCCTCCC	TGTCCCTGAG	GTCAGGCGTG	GGCCAGCTGG	CTCATCTCTT	TAATGTATCT
3781	CCTGGTGTGG	TCCTTGCTTC	CCCTTCTCCA	CCCCAGTGTA	ATAGGAAGGT	CTATCACGAC
3841	CACCATGAGT	TCCCTGCCCA	TCACTGGAGG	TCTTCAGCCA	AAAGCAACAC	TGTGGAGCCC
3901	TGTGCCCTCA	GGTTGGAAGG	GAATCTTCTA	GATGCCAGCA	AGAAGGGCCT	TCCCTGTTTT
					Exon 4	
3961	TGGCCCAGGC	CTACTCTCTC	CATCCCCCAC	TTACTTGTCT	TCCTGTGCTC	TGTGTGCAGC
4021	ATAACTCCTG	GGGGAAGCAG	TATTCCTACG	CCCTCTTCAA	GGCCATGAGC	CATATGCTGT
4081	GCATTGGGTA	TGACCGGCAG	GCACCCGTAG	GCATGTCTGA	CGTCTGGCTC	ACCATGCTCA
4141	GCATGATCGT	GGGGGCCACC	TGCTATGCCA	TGTTTCATCG	CCACGCCACT	GCCCTCATCC

Y527F Mutation

4201	AGTCGCTAGA	CTCCTCCCGG	CGCCAGTTC	AGGAGAAGGT	AGGTTGATCA	CTGTGCCCAC
4261	CCAGGGGTTT	CTCAGGAGGA	TCTGGTCCCT	GGGCTGTGTC	AGGAGGAAGC	ATACCTGGCC
4321	AATAAATGGG	TGCCCAGGCT	CACAACGTGC	AGTACTGTGG	TGGGCAGTCT	TAGATGAGAG
4381	CCTTGTCGAG	TCCCTGACTT	AGACCTGCTC	CGCACACGCC	CTTCCTTCCT	CTCGAGTCAT
4441	CTCTTTACTT	GCAGGGGCCA	CTACCTCAT	TGTTGCTAAA	TCGAGTAAGG	TTCTGAAGCC
4501	TCTTGCTGCT	TCAGTGTGAC	CGGGCTCCCA	CTCCTTAGCT	TCGCACTTGG	TTTCTAGGAC
4561	CGCATAGTTA	TGGCCAGTCC	TCCCTGCCCG	CCTCCCACCT	CAGGACCCTG	AGTGCTCTGA
4621	CCCTGTTGAG	GCTTCTCAGG	CATCCTCTTC	TGCACACCAC	GCTCACATGC	TCCTGCTATC
4681	ACCAGCCCAG	CCCATTTCTCA	GCTCCAGTGT	TTCTTGGGTG	GCCTGCGGGG	CACCCACCCC
4741	ATCATGTATA	ACATCAGAGT	AGCCCCCTTA	CTCCCTGTGC	ACACCAAACC	TCCACTCTGC
4801	CCATTTTACT	GACAAACCCT	AGGAGCTCAG	ACCTTAACCA	GGAGCTATCA	GCCAAGTTTG

3 G fehlen

4861	ATGATACTGT	CAAATGCGGG	GGGGGGGCGG	TGAGGGGGAA	GGGAGGGGAA	AGCAGGAAAG
4921	CTTGCTTGCT	TTGAGGAGGC	AGGAAGAGAA	AGTGGGAGAG	AATTCTAGGC	CAGTGGTGTT
4981	GGGGAAGATG	GTAAGAAACA	ACATTCTGGG	TTAGCAGGAA	GTTGGGGTGA	GGGTGGGGTC
5041	AGATAGAATA	GGAGTCAGGT	CAGGCCTAGG	TGAGGATCTG	TCTAAAGCCA	GCATCAGGGC
5101	CCAGCCTGTG	CTATACACAA	CACAAAGGCT	GTGTGGTCTG	TTACACCACA	ACCAGACTGA
5161	AGTCGCTTGT	GACGTCTTCA	AGATTTTCCC	TTATTTTATT	CTTGGGTAA	TCTTGTGGAT
5221	TTACCTTAAG	ATCTTTCTGA	AACCTCTTAC	CTCTCTACCC	CACCCCCACC	CCATCTCTTC
5281	CCTAGGCGAC	TCCAGCAGCC	TTCTAAGTCC	TGCTTGGTGT	TCCTCCATCT	GTTTATTGAG
5341	AGGCATTTCT	CCAAAACACA	ACTCCAAATG	TGCAGGCTGC	CTCTGTCACA	ATGGCTGGCC
5401	AGGAGGCTAC	TGTCTTGCCA	GGCTGTCTTA	CTGGGCTGCT	GTTAAACAAA	CAAACAAACA

5461 AGCAAACAAA ACTCAGCCGG GAGAAGTGGT ATATGCTTTG AGTCCCTGCA GAGGCAGAGG **8 bp Insertion**
 5521 **CAG**AGAGGCA GAGAGGCAGA GAGGCAGAGA GGCAGAGAGG CAGAGAGGCA GAGAGGCAGA
 5581 GAGGCAGAGA GGCAGAGAGG CAGAGAGGCA GAGGCAGGCA GATCTTCATG AGCTGGAGGC
 5641 AAGCCTGGTT TACAAAGTGA GTTTCAGGCA GAACATCCAG GACTCTACAC AGAGAAACCC
 5701 TGTGTCAAAA AAACAAAAAC AAAACCACCA CCACCACCAC CATCACCACCT ACCACCACCA
 5761 CCACCAAATC TCAAGGTCTC AGCTGAGGCC ATATCTATCT ACAGACACAG CTTGCAAAGA
 5821 GTCAGGTGTT CTCACTTGCA CTTCTGTAT TGTGCCCCAT TGCAGCTCTG TCTGTTACTG
 5881 GGCCTATTTC TCCTGGCAGG AGTTGGTGAC TCCAATATGC TTAGAGGAAA **SpeI BsmI**
 SspI BamHI XhoI **loxP** **CTAGTGAATG**
 5941 **CCAAATATTGG ATCCCTCGAG** ATCTAGATAT CGATGAATTC **ATAACTTCGT ATAATGTATG**

die **ACN Kasette** befindet sich zwischen den loxP Seiten

6001 **CTATACGAAG TTAT**GGATCT GTCGATCGAC GGATCGATCC GAACAAACGA CCCAACACCC
 6061 GTGCGTTTTA TTCTGTCTTT TTATTGCCGA TCCCCTCAGA AGAACTCGTC AAGAAGGCGA
 6121 TAGAAGGCGA TGCCTGCGA ATCGGGAGCG GCGATACCGT AAAGCACGAG GAAGCGGTCA
 6181 GCCCATTCGC CGCCAAGCTC TTCAGCAATA TCACGGGTAG CCAACGCTAT GTCCTGATAG
 6241 CGGTCCGCCA CACCAGCCG GCCACAGTCG ATGAATCCAG AAAAGCGGCC ATTTTCCACC
 6301 ATGATATTTCG GCAAGCAGGC ATCGCCATGG GTACAGACGA GATCCTCGCC GTCGGGCATG
 6361 CGCGCCTTGA GCCTGGCGAA CAGTTCGGCT GGCGCGAGCC CCTGATGCTC TTCGTCCAGA
 6421 TCATCTCTGT CGACAAGACC GGCTTCCATC CGAGTACGTG CTGCTCGAT GCGATGTTTC
 6481 GCTTGGTGGT CGAATGGGCA GGTAGCCGGA TCAAGCGTAT GCAGCCGCGG CATTTGCATCA
 6541 GCCATGATGG ATACTTTCTC GGCAGGAGCA AGGTGAGATG ACAGGAGATC CTGCCCCGGC
 6601 ACTTCGCCCA ATAGCAGCCA GTCCCTTCCC GCTTCAGTGA CAACGTCGAG CACAGCTGCG
 6661 CAAGGAACGC CCGTCGTGGC CAGCCACGAT AGCCGCGCTG CCTCGTCTCTG CAGTTTCATTC
 6721 AGGGCACCGC ACAGGTCGGT CTTGACAAAA AGAACCGGGC GCCCCTGCGC TGACAGCCGG
 6781 AACACGGCGG CATCAGAGCA CCGGATTGTC TGTGTGCCC AGTCATAGCC GAATAGCCTC
 6841 TCCACCCAAG CGGCCGGAGA ACCTGCGTGC AATCCATCTT GTTCAATGGC CGATCCCAT
 6901 TTGGCTGCAC GGATCCTGAA CGGCAGAGGT TACGGCAGTT TGTCTCTCCC CCTTCCGGGA
 6961 GCCACCTTCT TCTCCAACCG TCCCGGTGCG GCTCTCGGCG CTTCTGAGGA GAGAACTGGC
 7021 TGAGTGACGC CCTTTATAGA TTCGCCCTTG TGTCCCGCCC CTTCCTTTCC CGCCCTCCCT
 7081 TGCCTACGG GGCCGCCCGC ACCGGCCTAC ACGGAGCGCG CGCGGCGGAG TTGTTGACGC
 7141 TAGGGCTCCG GCTCCCTGGT TGGGTGTTCT TTCTGACGCG ACAGGAGGAG GAGAATGTTT **1 T Insertion**
 7201 CTGGTCCTGT CGTCTCCTT TCGGGTTTCC CGTGCACTCA AACCAGGAC TTACAGAACG
 7261 GAGGATAAAG TTAGGCCATT TTTACTCAGC TTCGGAGTTC AGGCTCA **1 T fehlt** TCAGCTAAAG
 7321 TCTCTCATTA GTATCCCCC ACACACATCG GGAAAAATGGT TTGTCTACG CATCGGTAAT
 7381 TAAGGCGGGG CCCTTCGGGT CTTCCGAGC GGGTTCCGGG GGTGGGGGGA AGGAGGGAGG
 7441 GACGGGACGG GCCTCGTTCA TGAATATTCA GTTACCCGCT GAATATGCAT AAGGCAGGCA
 7501 AGATGGCGCG TCCAATCAAT TGGAAGTAGC CGTTATTAGT GGAGAGGCC CAGGACGTTG
 7561 GGGCACCGCC TGTGCTCTAG TAGCTTTACG GAGCCCTGGC GCTCGATGTT **1 A fehlt** CAGCCCAAGC
 7621 TTTCGCGAGC TCGACCGAAC AAACGACCCA ACACCCGTGC GTTTTATTCT GTCTTTTAT
 7681 TGGCGCTCAG CTTTACAGTG ACAATGACGG CTGGCGACTG AATATTAGTG CTTACAGACA
 7741 GCACTACATA TTTTCCGTCG ATGTTGAAAT CCTTCTCAT ATGTCACCAT AAATATCAAA
 7801 TAATTATAGC AATCATTTAC GCGTTAATGG CTAATCGCCA TCTTCCAGCA GGCGCACCAT
 7861 TGCCCTGTT TCACTATCCA GGTACGGAT ATAGTTCATG ACAATATTTA CATTTGGTCCA
 7921 GCCACCAGCT TGCATGATCT CCGGTATTGA AACTCCAGCG CGGGCCATAT CTCGCGCGGC
 7981 TCCGACACGG GCACTGTGTC CAGACTAGGC CAGGTATCTC TGACCAGAGT CATCTAAAA
 8041 TACACAAACA ATTAGAATCA GTAGTTTAAAC ACATTATACA CTAAAAAATT TTATATTAC
 8101 CTTAGCGCCG TAAATCAATC GATGAGTTGC TTCAAAAATC CCTTCCAGGG CGCGAGTTGA
 8161 TAGCTGGCTG GTGGCAGATG GCGCGGCAAC ACCATTTTTT CTGACCCGGC AAAACAGGTA
 8221 GTTATTCGGA TCATCAGCTA CACCAGAGAC GGAAATCCAT CGCTCGACCA GTTTAGTTAC
 8281 CCCAGGCTA AGTGCCCTTCT CTACACCTGC GGTGCTAACC AGCGTTTTTCG TTCTGCCAAT
 8341 ATGGATTAAC ATTCTCCCAC CGTCAGTACG TGAGATATCT TTAACCCTGA TCCTGGCAAT
 8401 TTTCCGTATA CGTAACAGGG TGTATAAGC AATCCCCAGA AATGCCAGAT TAGCTATATC
 8461 CTGGCAGCGA TCGCTATTTT CCATGAGTGA ACGAACCTGG TCGAAATCAG TCGGTTTCGAA
 8521 CGCTAGAGCC TGTTTTGCAC GTTACCCGGC ATCAACGTTT TCTTTTCGGA TCCGCCGCAT
 8581 AACCAGTGAA ACAGCATTGC TGTCACTTGG TCGTGGCAGC CCGGACCGAC GATGAAGCAT
 8641 GTTTAGCTGG CCCAAATGTT GCTGGATAGT TTTTACTGCC AGACCGCGCG CCTGAAGATA
 8701 TAGAAGATA TCGCGAACAT GTTCAGGTTT TCGGGGAAAC CATTTCCGGT TATTCAACTT
 8761 GCACCATGCC CGCCACGACC GGCAACCGGA CAGAAGCATT TTCCAGGTAT GCTCAGAAAA
 8821 CGCCTGGCGA TCCCTGAACA TGTCCATCAG GTTCTTGCGA ACCTCATCAC TCGTTGCATC
 8881 GACCGGTAAT GCAGGCAAAT TTTGGTGTAC GGTCAAGTAA TTGGACACCT TCCTCTTCTT
 8941 CTTGGGCATG GCCGCAGGAA AGCAGAGCCC TGAAGCTCCC ATCACCAGCC AATAAGAGCC

9001 AAGCCTGCAG TGTGACCTCA TAGAGCAATG TGCCAGCCAG CCTGACCCCA AGGGCCCTCA
 9061 GGCTTGGGCA CACTGTCTCT AGGACCCTGA GAGAAAGACA TACCCATTTC TGCTTAGGGC
 9121 CCTGAGGATG AGCCAGGGG TGCTTGGCA CTGAAGCAAA GGACACTGGG GCTCAGCTGG
 9181 CAGCAAAGTG ACCAGGATGC TGAGGCTTTG ACCAGAAGC CAGAGGCCAG AGGCCAGGAC
 9241 TTCTCTTGGT CCCAGTCCAC CCTCACTCAG AGCTTTACCA ATGCCCTCTG GATAGTTGTC
 9301 GGGTAACGGT GGACGCCACT GATTCTCTGG CCAGCCTAGG ACTTCGCCAT TCCGCTGATT
 9361 CTGCTCTTCC AGCCACTGGC TGACCGGTTG GAAGTACTCC AGCAGTGCCT TGGCATCCAG
 9421 GGATCTGAG CCTACCAGGT CCTTCAGTAC CTCTGCCAG GGCTGGAGC AGCCAGCCTG
 9481 CAACACCTGC CTGCCAAGCA GAGTGACCAC TGTGGGCACA GGGGACACAG GGTGGGGCCC
 9541 ACAACAGCAC CATTGTCCAC TTGTCCCTCA CTAGTAAAAG AACTCTAGGG TTGCGGGGGG

loxP

9601 TGGGGGAGGT CTCTGTGAGG CTGGTAAGGG ATATTTGCCT GGCCCATGGA GATCCATAAC
 9661 TTCGTATAAT GTATGCTATA CGAAGTTATA AGCTTTCGCG AGCTCGAGGG ATCCTAGCTA

XhoI BamHI NheI

9721 GCTAGAATGC CCTAGTTAAC CCCACCCTCC TAGTCATTGT GGCTATAGTC AGCCCTGTTC
 9781 CCACTCATCT TTATAGTTTT GGGCATGGTG AGGACCAACC ATGGATGGAA GCCTCCTTCC
 9841 TTTTCTCCCT ACCTCCATCA CCCCGCAGAG CTGGGAGTCA GGGCCATTAT TTTGGGTACC
 9901 GTGTGCTTAC ATTACATTGA GCCCAAGTTA GCTAAGAAAG CCCAGGGGT GGAGTGTGCC

Exon 5

9961 TCTGGCTACC AGCCTGGGGT GCCTGGAGGT GACTCCTGTC TCTCTCCCC GTCTCAGTAT
 10021 AAACAGGTGG AGCAGTACAT GTCTTCCAC AAGCTCCCGC CTGACACCCG ACAGCGCATC
 10081 CATGACTACT ATGAACACCG CTACCAAGGC AAGATGTTTG ATGAGGAAAG CATCCTGGGT
 10141 GAGCTGAGTG AGCCACTTCG AGAGGTGAGC TGCAGACAGC CTGGGTGGGT GGTGGCGGTG
 10201 CCAGGCCTCG CTGGCACACA GTTCCCTGAC CTCTTCTTTT CTTGTGTGCC CAACCTTTGC

Exon 6

10261 TGTACGTGGA GCAGGAGATC ATCAACTTTA ACTGCCGAAA GCTGGTGGCA TCCATGCCAC
 10321 TGTTTGCCAA CGCAGATCCC AACTTTGTGA CATCCATGCT GACCAAGTTG CGTTTCGAGG
 10381 TCTTCCAGCC TGGGGATTAC ATCATCCGCG AAGGCACCAT CGCAAGAAG ATGTACTTTA
 10441 TCCAGCACGG CGTGGTCAGC GTGCTACTA AGGCAACAA AGAGACCAAG CTGGCTGATG
 10501 GCTCCTATTT TGAGGTGAG ACAGCCAGGG GGCCCAGGA GAACATGGGT GACTGGGAGC
 10561 TAAGCTAGAG GGATACCCTA AGATCAGAAG CTTGGAGGGA CCCTTTATAG CCACAGCCTG

17 bp Insertion

10621 GGATCTGTG AGGCCAGTAT AGGGGTGTCT GTCTGTGCAG TCTGCTTTAG TAGAGTACTT
 10681 AATTCTTAAG AAGCTTTAAG ACTGGTGGCT TATAAACCAT AGAACTGGA TTCTTAGCTC
 10741 TGGAGGCTGG GAGTCACAGG CCAGGGTGCA AGTGTGGTAG GTTCCATTGA GGTTCCTCTT
 10801 AGTGGTAGAC TGTGTGGTT TTGTTGTCTC AGATGGCAGG AAGAGCACTT GTGTTGTTTC
 10861 CTTAGCTTCT TCTATTATAT TTGCGTGTAT GCCTGAGCCT GCATATACCC AACCATACCT
 10921 ACCTATTTCC ACATACCACC ATGCCCGTAT AGAGGTTAGG GCACAACCTG GGCAGTCAAG
 10981 TCTCTCCTAC CATGTGGGTC CTGGGTATCC AACTCACGTT ATCAGACTTG GCCCGGAAGT
 11041 GCCATACTGC TGAGCCATCT GACTTGCCCC TTCTCTAGCC TCTTCTATAA AGGTATGAAT
 11101 CACCTCCCAA AGCCCCACCT CTAAGTTCCA GATCACCTTG AGACCAGGGG TTGCCCCCAG
 11161 AGAGAGAAAC AACTAGACAC CCAGTTGATA GGGGTGCTGC TGGTACCCAG TATGACTACA
 11221 ACCTATCAGG CAGCCTAGTG AGTTCATTGT ACCAACTACC AGTGGAGACT AAGGTCAGAA

11281 TCACGCAGCT CTGGGAGGCC TGGAAATTTT CTGTCGGATT GACCCTGAGC CCTGCTGTGC

stille Mutation (CTG > TTA)

Exon 7

R669E/T670A

11341 TCACAGAGAT CTGCTTGTAA ACCCGGGGTC GGGAAGCGGC CAGCGTCAGA GCGGATACTT
 11401 ATTGCCGCCT CTACTCACTG AGCGTGGACA ACTTCAATGA GGTGCTGGAG GAGTATCCCA
 11461 TGATGCGGAG GGCCTTCGAG ACGGTTGCGC TGGACCGCCT GGACCGCATA GGTGAGGAGC
 11521 AGGATGTGCA GCGGGGAGGG CAGGGCGGCA AGCATGCAGA CTCCAAGTCT CCTTTCCTGG

Exon 8

11581 GCGTGGCCTG AGTGCTGGC TCTTGTCTA TGGCTCAGGC AAGAAGAACT CCATCCTCCT
 11641 CCACAAGGTG CAGCAGCACC TCAACTCAGG CGTCTTCAAC TACCAAGAGA ACAGATCAT
 11701 CCAGCAGATC GTGCGGCATG ACCGTGAGAT GGCCCACTGT GCTCACCAGC TCCAGGCTGC
 11761 CGCCTCAGCC ACCCAACCC CCACGCCTGT TATATGGACC CCGCTGATCC AGGCGCCACT
 11821 GCAGGCTGCT GCTGCTACTA CTTCCGTGGC CATAGCCCTC ACACACCACC CCCGCTGCC
 11881 CGCCGCCATC TTCCGGCCCC CTCCCGGACC TGGGCTGGGC AACCTTGGGG CTGGACAGAC
 11941 ACCGAGGCAC CCAAGGAGGC TGCACTCCTT GATCCCTTCA GCTCTGGGCT CTGCTTCACC
 12001 CGCCAGCAGC CCCTCACAGG TGGACACACC GTCTTCATCC TCCTTCCACA TCCAACAGCT
 12061 GGCTGGATTG TCTGCACCTC CTGGATTGAG CCCTCTCCTG CCCTCTCTA GCTCTTCCCC
 12121 ACCTCCAGGA GCCTGCGGTT CCCCACAGC CCCCACACCC TCCACCTCCA CTGCCGCCGC
 12181 CGCTCCACC ACTGGGTTTC GCCACTTTCA CAAGGCGCTG GGTGGCTCCC TGTATCCTC
 12241 TGACTCCCCG CTGCTCACCC CACTGCAACC AGGCGCTCGC TCTCCACAGG CTGCCCAGCC

12301	ACCACCCCCA	CTGCCTGGGG	CCCAGGAGG	TCTGGGACTC	CTGGAGCACT	TCTTGCCGCC
12361	CCCACCCTCC	TCCAGGTCAC	CATCATCCAG	CCCTGGGCAG	CTGGGCCAGC	CTCCTGGAGA
12421	GTGTGCCCTA	GGTCTGGCAG	CTGGTCCATC	AAGTACACCA	GAGACACCCC	CACGGCCTGA
12481	GCGACCATCC	TTCATGGCAG	GGGCTCTGG	AGGGGCTTCT	CCTGTAGCCT	TTACCCCCCG
12541	AGGAGGCCTC	AGTCCTCCGG	GCCACAGCCC	GGGGCCCCCA	AGAACTTTCC	CGAGTGCCCC
12601	ACCCCGGGCC	TCTGGCTCCC	ATGGTTCCCT	GCTCCTGCCA	CCTGCATCCA	GCCCTCCACC
12661	TCACAGGTC	CCACAGCGCA	GGGGCACACC	ACCCCTCACC	CCTGGCCGCC	TCACACAGGA
12721	CCTGAAGCTC	ATCTCAGCCT	CTCAGCCAGC	CCTCCCCCAG	GATGGGGCAC	AGACTCTCCG
12781	CAGGGCCTCG	CCTCACTCCT	CAGGGGAGTC	GGTGGCTGCC	TTCTCACTCT	ACCCAGAGC
12841	TGGGGGTGGC	AGTGGGAGTA	GTGGGGCCCT	TGGGCCTCCT	GGAAGGCCAT	ATGGTGCCAT
12901	CCAGGCCCAA	CATGTCACTT	TGCCCTCGGA	GACATCCTCA	GGTCTTTTGC	CACCCCCACT
12961	TTCTTTGTTT	GGGGCAAGAG	CCGCCTCTTC	TGGAGGGCCC	CCTCTGACTA	CTGCTGCACC

Stopcodon (TGA)

13021	CCAGAGGGAA	CCTGGCGCTA	GGTCTGAGCC	AGTACGCTCC	AAACTGCCGT	CTAATTTATG
-------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

3' UTR

13081	AGCTGGGCCC	TCCCTCCCTC	TTCTTTTTCT	TGCTCCTTTC	TTCCTTCAGG	TTTAACTGTG
13141	ATTAGGAGAT	ATACCAACAA	CAATAATAAC	CATAAAAAAA	CATACCCCAG	AAAAACAAAA
13201	AGACAGCAGA	AAATAACCAG	GTATTCTTAG	AGCTATAGAT	TTTTGGTCAC	TTGCTTTTAT
13261	AGACTATTTT	AATACTCAGC	ACTAGAGGGA	GAGAGGGAGG	GAGGGAGGGA	GGGGGGAGCA
13321	GACAAGCCCC	AAAGGCAACA	GCCAAAGGAA	GACAGGCGGG	GTCTCTGGGG	ACAGGGCAGG
13381	GGTGGGGTGA	CCCGTGTTTG	GGTCTTAGCA	TAGACCTGTC	ATTGTATTGT	TCTGTAGAGC
13441	AAGAGCTACC	TACCATCAAT	CAGTTCCTTG	GCTGTGAACT	TGGAGCCAC	TCTGCTGGGG
13501	GCTGCCCTGG	AGTGTGTTCC	CAGGAGCCTC	CTGCGCCCAA	GTTCCTTGGG	ACACACAGGG
13561	CCCTTGAGGG	CCTTGCTTTT	TTTTTTTCTA	CTGTAAACGT	AGCAAGATAT	GTATATGAAT
13621	ATGTATATGT	ATGTAAGATG	TGCTATGTA	TAGCTATGTA	GTGCTCTGTA	GAGCCGTGTA
13681	GATATCAGCT	TCCATGTGTG	CACATTCGTG	TGCAGTCTAG	TTAATCCCA	GTGTGCCAGG
13741	ACACCCAGGT	CACCTTACAT	CCAGCAATCT	GCTGTGGCCC	GCAGGCTGGG	CAGTGCAGGC
13801	TCTGGGGGAA	GTTCTCTCTC	CCAGCCCTCA	GGGAAGGGGA	CCCCTGGAAC	CTTGCAGCAG
13861	ACCTCTTTTC	CCATCTCTTG	GGCTGCAACC	CAGTTCTAGC	CCAACCTCTA	GTCCCATGGA
13921	AGGGGAAGAC	TCCAGGCCGA	GCCTTTCACC	TCCAGGGGCT	TCAAGCACAC	CTGTCACCTC
13981	TGTGGCCCCG	AGTTTCTCCA	GCTGTACAAC	GGGAGGGGAG	GGGAACGTCT	ATTTATTGAG
14041	TCTGTTCTGT	CCCAAGCACT	GGTTATACAT	ACTCACAGAC	TGGGGGGTGA	GAGTTATGGT
14101	TTCTCCCAT	TCACAGGTGA	GGAAACTGAG	GGTTGATTAG	AATCACATAA	CCAGGAGTGG
14161	CAGAGCTGGT	CTGGTCTGAG	CTGCAAATCA	ACCTCCCTAA	GGTTAAAGCC	TGTATTCTCT
14221	CCATCAGAAA	ACTGTGTTTG	GTACAGCCCT	AGCTTTTGGT	CCTAGGCAA	AGTACAGGAG
14281	GAAGAGATGG	GAGCTTGTTG	GCAGTCAGAC	TTCAGTTCAA	ATCCAGTTT	TGCCACTTCT
14341	TAGCTGTGTG	GCCTTGGGCA	AGTTATCTGA	CCTTCTGTG	CCCTCATTAG	TAAAATAAGA
14401	ACTATGGAAC	TGCTCACAA	TGACCAGTGA	GAACCAGATA	AGAAAAAGAT	GTGAACGCC

l C fehlt

14461	CAGCCCAGTG	CCTGGCACAC	AGCATAGTAG	GTGCTCAATA	AATCATGTTT	CTTACCACC
14521	CCCCCCTCA	TAAACTTAGC	CCATTGCTCC	AGTGAACAT	GATGAGAGCC	CAGGGGATTT
14581	TAGCTGAGGG	CTCCAAGACT	TAAAACCTC	AGGACTCAGG	AGGTGGCTGG	GCCTCCATCA
14641	TGGCTGGAGG	AAGGTGCGTG	GCCAGTGGTG	GGCTTGAGTC	AGGCCTTGGG	ATATGGGAAG
14701	TGTGGGTAAA	GAAAGGAATT	AGAGGAGAGA	GTGCATAGGA	GAGGTTACTG	CAGTGATGTT
14761	GAGATGTGGG	GCAGGGCCTC	TGGGGGAGAC	ATAGAGGATG	GGGACCTCGG	ATGAGAGGCT
14821	AAGCTGATCT	GTGGCTTTGG	CCCTGAATTA	GAAGCAGATG	TCAGGACCCT	GGAGGAGGCA
14881	CAGCCAACAG	CTTCCTTATC	CATGGGTCGG	AGCAGGTAGG	ACTGATGCCC	GTGCAGTGAG
14941	GGGGCTGGTT	CTACCATGCC	TGTCATCCCC	ATGCAGCAGC	CAGAAGGGTG	GCATGAGCAG
15001	GTTTGGCCCT	GGGGTGCCAC	AGGGAATCCG	TTGTGGGTGG	CTTGCAGGGA	AAGAGAGGGT
15061	GAAGTCCCTG	GTGCCCTAGA	AAATCTGCAG	GAGCCCTAGG	TTATACAGGG	CTGGGAGAGG
15121	CCTCCACAGC	TGAGAGTCTT	CGGACCTGTG	TTCTGTCCCC	CAAGAAAGGG	AGCTTAGGGA
15181	GCCAGCTGGA	CGCCACAGAA	CCTGCAGTCC	ACCCCTGAGG	AATAGGAGAG	GAGCTGGGGT
15241	CTGGGATAAG	GAGTGAGGGG	TCTCTTGTC	ACAGGCCTGG	CCTAGCCACC	CTTCTCTACT

BssHII

NsiI

AscI (für Linearisierung des Targeting Vektors)

15301	GATACATGCA	TGGCGCGCG	CGCGCTTGGC	GTAATCATGG	TCATAGCTGT	TTCTGTGTG
15361	AAATTGTTAT	CCGCTCACAA	TTCCACACAA	CATACGAGCC	GGAAGCATAA	AGTGTAAGC
15421	CTGGGGTGCC	TAATGAGTGA	GCTAACTCAC	ATTAATTGCG	TTGCGCTCAC	TGCCCGCTTT
15481	CCAGTCGGGA	AACCTGTCTG	GCCAGCTGCA	TTAATGAATC	GGCCAACGCG	CGGGGAGAGG
15541	CGGTTTGCGT	ATTGGGCGCT	CTTCCGCTTC	CTCGCTCACT	GACTCGCTGC	GCTCGGTCTG
15601	TCGGCTGCGG	CGAGCGGTAT	CAGCTCACTC	AAAGGCGGTA	ATACGGTTAT	CCACAGAAATC
15661	AGGGGATAAC	GCAGGAAAGA	ACATGTGAGC	AAAAGGCCAG	CAAAAGGCCA	GGAAACGTAA
15721	AAAGGCCGCG	TTGCTGGCGT	TTTTCCATAG	GCTCCGCCCC	CCTGACGAGC	ATCACAAAAA
15781	TCGACGCTCA	AGTCAGAGGT	GGCGAAACCC	GACAGGACTA	TAAAGATACC	AGGCGTTTCC
15841	CCCTGGAAGC	TCCCTCGTGC	GCTCTCCTGT	TCCGACCCTG	CCGCTTACCG	GATACCTGTG

15901	CGCCTTTCTC	CCTTCGGGAA	GCGTGGCGCT	TTCTCATAGC	TCACGCTGTA	GGTATCTCAG
15961	TTCGGTGTAG	GTCGTTCGCT	CCAAGCTGGG	CTGTGTGCAC	GAACCCCCCG	TTCAGCCCCGA
16021	CCGCTGCGCC	TTATCCGGTA	ACTATCGTCT	TGAGTCCAAC	CCGGTAAGAC	ACGACTTATC
16081	GCCACTGGCA	GCAGCCACTG	GTAACAGGAT	TAGCAGAGCG	AGGTATGTAG	GCGGTGCTAC
16141	AGAGTTCTTG	AAGTGGTGGC	CTAACTACGG	CTACACTAGA	AGGACAGTAT	TTGGTATCTG
16201	CGCTCTGCTG	AAGCCAGTTA	CCTTCGGAAA	AAGAGTTGGT	AGCTCTTGAT	CCGGCAAACA
16261	AACCACCGCT	GGTAGCGGTG	GTTTTTTTGT	TTGCAAGCAG	CAGATTACGC	GCAGAAAAAA
16321	AGGATCTCAA	GAAGATCCTT	TGATCTTTTC	TACGGGGTCT	GACGCTCAGT	GGAACGAAAA
16381	CTCACGTAA	GGGATTTTGG	TCATGAGATT	ATCAAAAAGG	ATCTTCACCT	AGATCCTTTT
16441	AAATTA AAAA	TGAAGTTTTA	AATCAATCTA	AAGTATATAT	GAGTAAACTT	GGTCTGACAG
16501	TTACCAATGC	TTAATCAGTG	AGGCACCTAT	CTCAGCGATC	TGTCTATTTT	GTTTCATCCAT
16561	AGTTGCCTGA	CTCCCCGTCG	TGTAGATAAC	TACGATACGG	GAGGGCTTAC	CATCTGGCCC
16621	CAGTGCTGCA	ATGATACCGC	GAGACCCACG	CTCACCGGCT	CCAGATTTAT	CAGCAATAAA
16681	CCAGCCAGCC	GGAGGGGCCG	AGCGCAGAAG	TGGTCCTGCA	ACTTTATCCG	CCTCCATCCA
16741	GTCTATTAAT	TGTTGCCGGG	AAGCTAGAGT	AAGTAGTTCTG	CCAGTTAATA	GTTTGCGCAA
16801	CGTTGTTGCC	ATTGCTACAG	GCATCGTGGT	GTCACGCTCG	TCGTTTG GTA	TGGCTTCATT
16861	CAGCTCCGGT	TCCCAACGAT	CAAGGCGAGT	TACATGATCC	CCCATGTTGT	GCAAAAAAGC
16921	GGTTAGCTCC	TTCCGGTCCTC	CGATCGTTGT	CAGAAGTAAG	TTGGCCGCAG	TGTTATCACT
16981	CATGGTTATG	GCAGCACTGC	ATAATTCTCT	TACTGTCATG	CCATCCGTAA	GATGCTTTTC
17041	TGTGACTGGT	GAGTACTCAA	CCAAGTCATT	CTGAGAATAG	TGTATGCGGC	GACCGAGTTG
17101	CTCTTGCCCG	GCGTCAATAC	GGGATAATAC	CGCGCCACAT	AGCAGAACTT	TAAAAGTGCT
17161	CATCATTGGA	AAACGTTCTT	CGGGGCGAAA	ACTCTCAAGG	ATCTTACCGC	TGTTGAGATC
17221	CAGTTCGATG	TAACCCACTC	GTGCACCCAA	CTGATCTTCA	GCATCTTTTA	CTTTCACCAG
17281	CGTTTCTGGG	TGAGCAAAAA	CAGGAAGGCA	AAATGCCGCA	AAAAAGGGAA	TAAGGGCGAC
17341	ACGAAAATGT	TGAATACTCA	TACTCTTCCT	TTTTCAATAT	TATTGAAGCA	TTTATCAGGG
17401	TTATTGTCTC	ATGAGCGGAT	ACATATTTGA	ATGTATTTAG	AAAAATAAAC	AAATAGGGGT
17461	TCCGCGCACA	TTTCCCCGAA	AAGTGCCAC			

10. Lebenslauf

Andreas Scharr

geboren am 08.02.1983 in Augsburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

11. Publikationen

- Fenske S, Mader R, **Scharr A**, Pappas C, Cao-Ehlker X, Michalakos S, Shaltiel L, Weidinger M, Stieber J, Feil S, Feil R, Schneider A, Hofmann F, Wahl-Schott C, Biel M. (2011) "HCN3 Contributes to the Ventricular Action Potential Waveform in the Murine Heart." Circulation research.
- Direnberger S, Mues M, Micale V, Wotjak C, Dietzel S, Schubert M, **Scharr A**, Wahl-Schott C, Biel M, Krishnamoorthy G, Griesbeck O. "Biocompatibility of a Genetically Encoded Calcium Indicator in a Transgenic Mouse Model". Nature Communications (under review)